

FABIANA DE TONI

***Escherichia coli* SHIGA TOXIGÊNICA (STEC)  
EM CRIANÇAS NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas, Área de Concentração Análises  
Clínicas, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da  
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cyntia M. T. Fadel  
Picheth

CURITIBA

2004

## TERMO DE APROVAÇÃO

FABIANA DE TONI

"*Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) em crianças no estado do Paraná."

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Cyntia Maria Teles Fadel Picheth (orientadora)  
Universidade Federal do Paraná

  
Dra Kinue Irino  
Instituto Adolfo Lutz

  
Prof. Dr. Salmo Raskin  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Curitiba, 18 de fevereiro de 2004

*Meu pai sempre me disse que todas as coisas  
devem ser feitas com amor e, minha mãe  
me ensinou que não devemos fazer  
menos do que podemos.  
À minha família dedico todo  
o trabalho contido nesta dissertação,  
que foi feita assim: com amor e dedicação.*

## AGRADECIMENTOS

Os dois anos de mestrado foram para mim de grande aprendizado. E eu achei que devia contar uma história para explicar o porquê de tantos agradecimentos.

Fazia apenas um ano que estava atuando em Análises Clínicas com Qualidade, quando surgiu a oportunidade de fazer o mestrado, aqui em Curitiba e na Federal. Desde o começo da faculdade de Farmácia, aqui na UFPR, acabei me envolvendo com pesquisa e com canto. Trabalhei com polímeros sintéticos e com carboidratos, mas não era bem aquilo o que eu estava procurando. Quando fui apresentada à Microbiologia, me apaixonei pelas bactérias e pelos vírus. O cheiro do ágar, as cores das colônias e das reações de identificação. Foi amor à primeira vista. Embora não tenha conseguido nenhum estágio trabalhando especificamente com bactérias ou vírus, eles sempre estiveram por perto. Minha participação em um projeto com polímeros sintéticos foi justamente para trabalhar com biodegradação. Meu segundo projeto de iniciação científica, envolveu o isolamento de um polissacarídeo de um fungo fitopatogênico. Mas foi cantando que o mestrado apareceu em minha vida. A grande responsável foi uma amiga farmacêutica mezzo-soprano, Elisa.

Desse modo acabei pesquisando aquilo que eu desejava. Providência divina. Eu ainda não sabia o que eu iria fazer quando Deus colocou em meu caminho, nas últimas semanas do nivelamento, minha orientadora. Aconselhada pelo Dr. Arnaldo Akira, eu tinha em mente que seria bom aprender técnicas de biologia molecular e sabia que queria realizar uma pesquisa em Microbiologia que pudesse ser útil para bastante gente. Apesar de toda utopia que envolvia essa aspiração, hoje eu vejo que fui realmente muito abençoada. Na verdade, muitas vezes abençoada. Minha pesquisa foi voltada para o diagnóstico de uma bactéria, cuja principal característica de virulência foi adquirida de um vírus, em uma população com diarreia, doença que tem alta incidência nos países em desenvolvimento e a pesquisamos através de PCR.

Fui muitas outras vezes agraciada. Tive a melhor orientação que alguém pode querer; fui incentivada a dar o melhor de mim e a não desanimar perante os

problemas que apareceram. E eles apareceram. Aprendemos muitas coisas juntas, o que só fez crescer minha admiração. Também ensinei após ter aprendido, várias vezes para pessoas diferentes, e fiz aqueles que ensinei ensinarem outros, o que foi muito bom. Estudei em uma Universidade pública e gratuita e com todos os empecilhos que isso representou no laboratório, tudo foi acontecendo pouco a pouco, um obstáculo vencido de cada vez, com muita ajuda da minha orientadora. Consegui uma bolsa porque uma das colegas, Dani, desistiu da sua para trabalhar. E eu, que estava trabalhando e estudando, pude me dedicar mais.

Agradeço a realização deste trabalho:

Às crianças, jovens e adultos que colaboraram com a realização deste trabalho através da doação de suas amostras.

Ao Laboratório do Hospital Pequeno Príncipe, em especial ao setor de Bacteriologia, na pessoa dos Farmacêuticos Bioquímicos Cláudio Alberto de Biaggi e Sérgio L. dos Santos pelas amostras.

Ao Laboratório Central do Estado - LACEN, em especial ao setor de Bacteriologia, na pessoa da Farmacêutica Bioquímica Sônia Farrah meu MUITO OBRIGADA pelas amostras, sorologia, identificação de organismos e outras gentilezas.

Ao setor de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em especial à Dra. Cristina e todos os residentes que se envolveram na realização da coleta das amostras.

Meu OBRIGADÍSSIMO ao Prof. Rogério Kopp, à técnica Clari e ao saudoso Seu Amador do Laboratório de Parasitologia da UFPR pelas amostras preciosas e por sua disposição em nos ajudar nesta empreitada.

Aos amigos do Laboratório Champagnat, em especial ao Farmacêutico Bioquímico Arnaldo Akira Yokoo pelas sugestões. Aos técnicos Cecília, Valmir, Rucineide, Angelina e Janaína por se preocuparem em separar as amostras.

Ao Departamento de Bioquímica. OBRIGADA Dr. Emanuel Souza e Dr. Fábio Pedrosa pela sua valiosa colaboração na realização deste.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos, Hematologia (Ivone), Controle de Qualidade (Geni) e Bioquímica Clínica (Sidnei, Profa. Vânia) por toda a ajuda.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Ao Prof. Cid e Profa. Almeriane pelo auxílio com as traduções de resumos para congressos. À

Profa. Márcia pelas sugestões e pela paciência na leitura dos relatórios. À Regina pela presteza e gentileza.

Ao Mário e ao Laboratório Hormocentro pelas amostras.

À CAPES pelo suporte à pesquisa.

Aos professores, funcionários, alunos de iniciação científica, monitores e estagiários voluntários do Laboratório de Bacteriologia da UFPR pelo apoio, com carinho à Celene, Larissa, Juliana, André e Gisele.

Obrigada Caroline Pigatto (mestranda em Medicina Veterinária) e a todos aos amigos da turma de 2002 (Carla, Waldemar, Elisa, Lilian, Maria Luiza, Carolina, Cláudia, Giovanna, Carmem, Maria Teresa, Danilo, Daniele, Renato, Luíne, Kettelin, Carlos) pelas discussões, idéias, coleguismo e amizade. Elisa se não fosse você eu não estaria aqui hoje.

À minha jovem orientadora, Dra. Cyntia, pela orientação, companheirismo, conselhos e momentos de felicidade compartilhados. É importante dizer como você foi fundamental para o meu crescimento, o quanto se preocupou em que eu aprendesse a ter idéias cientificamente corretas e críticas para “fazer Ciência”. Você me ajudou a crescer. Aprendi que conhecimento se adquire estudando e se dedicando àquilo que temos paixão. Obrigada.

Ao Prof. Geraldo Picheth pelas sugestões, empréstimos, discussões e por toda a paciência e gentilezas.

Obrigada Alessandre, Marcos, Adriana e Claiton por sua paciência e colaboração quando precisei “visitar e fotografar” as minhas bactérias nos finais de semana, quando tive que ficar fazendo pesquisas ou até altas horas digitando.

À minha família, pela compreensão quando estive ausente e quando estive impaciente. À minha mãe e ao meu pai que sempre me incentivaram a estudar.

E finalmente, gostaria de agradecer por todo o aprendizado, pela maravilhosa família que tenho e pelas novas e antigas amizades à Deus. Quando penso em Deus e em pesquisas científicas, lembro-me da Profa. Márcia que ministrou Biologia Celular no mestrado, uma das pessoas que indiretamente me fez acreditar com mais força que a Ciência vai sempre estar muito próxima e muito distante da explicação dos milagres da vida e, gostaria de lembrar uma frase de um pesquisador que ela citou: “quanto mais estudo e mais perfeito vejo que é, sinto-me cada vez mais próximo de Deus”.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT .....	xv
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 <i>Escherichia coli</i> Shiga toxigênica.....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Diversidade entre as STEC .....	20
<b>2.2 Fatores de virulência.....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Toxinas Shiga.....	21
2.2.2 Proteínas de adesão .....	26
2.2.2.1 Intimina.....	26
2.2.2.2 Saa.....	27
2.2.2.3 Outras proteínas de adesão .....	27
2.2.3 Fatores de virulência acessórios .....	28
<b>2.3 Fontes de transmissão .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Manifestações clínicas da infecção por STEC.....</b>	<b>29</b>
2.4.1 Colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica .....	30
<b>2.5 Patogênese da infecção .....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 Diagnóstico laboratorial das infecções causadas por STEC .....</b>	<b>33</b>
2.6.1 Métodos microbiológicos .....	33
2.6.2 Ensaio biológico.....	34
2.6.3 Ensaio imunológico.....	34
2.6.4 Ensaio molecular .....	35
<b>2.7 STEC no Brasil .....</b>	<b>36</b>
<b>2.8 Objetivos .....</b>	<b>37</b>
2.8.1 Objetivo geral .....	37

2.8.2 Objetivos específicos .....	37
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Amostra.....</b>	<b>38</b>
3.1.1 Descrição da amostra .....	38
3.1.2 Coleta e transporte.....	38
<b>3.2 Bactérias utilizadas como controles .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3 Reagentes .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4 Condições de cultivo .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5 Extração de DNA .....</b>	<b>39</b>
3.5.1 Extração de DNA genômico segundo PATON .....	40
3.5.2 Extração de DNA genômico segundo OLSVIK e STROCKBINE .....	40
3.5.3 Extração de DNA genômico segundo AUSUBEL.....	40
<b>3.6 PCR.....</b>	<b>41</b>
3.6.1 PCR para triagem de STEC através da amplificação dos genes <i>stx</i> .....	41
3.6.2 PCR Multiplex para amplificação dos genes <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>eaeA</i> e <i>hlyA</i> .....	41
3.6.3 Detecção dos produtos de PCR.....	42
<b>3.7 Limite de detecção do protocolo para triagem de STEC .....</b>	<b>43</b>
<b>3.8 Determinação da sensibilidade e especificidade do protocolo .....</b>	<b>43</b>
3.8.1 Comparação entre PCR e o ensaio de citotoxicidade para STEC .....	43
<b>3.9 Pesquisa de colônias de STEC .....</b>	<b>44</b>
<b>3.10 Identificação bioquímica das STEC .....</b>	<b>44</b>
<b>3.11 Seqüenciamento de DNA.....</b>	<b>44</b>
<b>3.12 Teste de susceptibilidade aos antibióticos.....</b>	<b>45</b>
<b>3.13 Tipagem sorológica .....</b>	<b>45</b>
<b>3.14 Imunoensaio para detecção de toxina Shiga.....</b>	<b>45</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Protocolo para triagem de STEC através da amplificação dos genes <i>stx</i> ...</b>	<b>46</b>
4.1.1 Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores.....	46
4.1.2 Amplificação dos genes <i>stx</i> .....	46
4.1.3 Extração de DNA.....	47
<b>4.2 Limite de detecção do protocolo .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Sensibilidade e especificidade do protocolo.....</b>	<b>50</b>
4.3.1 Comparação entre PCR e o ensaio de citotoxicidade .....	50



4.4 Triagem das amostras de fezes para a presença de STEC .....	51
4.5 Identificação bioquímica e perfil de susceptibilidade das bactérias .....	53
4.6 Teste das bactérias frente ao antisoro O157 .....	53
4.7 Imunoensaio para detecção de toxina Shiga .....	53
4.8 PCR multiplex para os genes de virulência <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>eaeA</i> e <i>hlyA</i> .....	55
4.9 Sequenciamento dos amplicons.....	56
5 DISCUSSÃO .....	62
6 CONCLUSÕES .....	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS .....	85
ANEXO 1.....	86
ANEXO 2.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	– <i>American type culture collection</i>
cAMP	– Adenina monofosfato cíclico
CDC	– <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cGMP	– Guanina monofosfato cíclico
CTAB	– Brometo de cetil-trimetil-amônio
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
dNTP	– Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
EHEC	– <i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica
EPEC	– <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
Kb	– Kilobase
NM	– <i>Non motile</i>
NCCLS	– <i>The National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
pb	– Pares de bases
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pmol	– Picomol
RNAr	– Ácido ribonucléico ribossomal
SDS	– Dodecilsulfato de sódio
SHU	– Síndrome hemolítico-urêmica
SLTEC	– <i>Shiga-like toxin-producing Escherichia coli</i>
STEC	– <i>Shiga toxicogenic Escherichia coli</i>
Stx	– Toxina Shiga
Stx1	– Toxina Shiga 1
Stx2	– Toxina Shiga 2

<i>stx</i> <sub>1</sub>	– Gene da toxina Shiga 1
<i>stx</i> <sub>2</sub>	– Gene da toxina Shiga 2
Tris	– Tris-hidroximetil aminometano
TNF- $\alpha$	– Fator de necrose tumoral
TTP	– Púrpura trombocitopênica trombótica
UFC	– Unidade formadora de colônia
VTEC	– <i>Vero cytotoxin-producing Escherichia coli</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - ESTRUTURA E SIMILARIDADE DAS TOXINAS SHIGA.....	22
Figura 2 - MECANISMO DE INTERNALIZAÇÃO E TRANSPORTE DAS TOXINAS SHIGA.....	23
Figura 3 - ESTRUTURA DO OPERON <i>stx</i> .....	24
Figura 4 - AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>stx</i> COM DNA DE STEC EXTRAÍDO ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS .....	48
Figura 5 - AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>stx</i> .....	49
Figura 6 - LIMITE DE DETECÇÃO DO PROTOCOLO DE TRIAGEM PARA STEC .....	49
Figura 7 - PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS EMPREGANDO OS INICIADORES PARA OS GENES <i>stx</i> .....	51
Figura 8 - POSITIVIDADE DAS AMOSTRAS POR PCR DURANTE O ANO .....	52
Figura 9 - PCR MULTIPLEX.....	55
Figura 10 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON M03 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE <i>stx</i> <sub>1</sub> .....	57
Figura 11 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON T83 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE STY 1063 DE <i>S. typhi</i> .....	57
Figura 12 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON D104 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE <i>stx</i> <sub>2</sub> .....	58
Figura 13 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON J210 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE <i>stx</i> <sub>2</sub> .....	59
Figura 14 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON C213 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE <i>stx</i> <sub>1</sub> .....	59

Figura 15 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON P215 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE <i>stx</i> <sub>1</sub> .....	60
Figura 16 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON D300 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE STY 1063 DE <i>S. typhi</i> .....	60
Figura 17 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON J307 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE <i>stx</i> <sub>2</sub> .....	61
Figura 18 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS AMPLICONS T83 E D300.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - SIMILARIDADE NA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS VARIANTES DE <i>stx</i> <sub>1</sub> E <i>stx</i> <sub>2</sub> .....	25
Tabela 2 - BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO CONTROLES .....	39
Tabela 3 - INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO MULTIPLEX DOS GENES DE VIRULÊNCIA .....	42
Tabela 4 - CONCENTRAÇÕES DOS REATIVOS EMPREGADOS NA PCR PARA OS GENES <i>stx</i> .....	47
Tabela 5 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E PCR.....	50
Tabela 6 - DADOS REFERENTES AS AMOSTRAS QUE APRESENTARAM BANDA DE AMPLIFICAÇÃO NA PCR .....	52
Tabela 7 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS NA TRIAGEM PARA <i>stx</i> .....	54
Tabela 8 - PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DAS BACTÉRIAS ISOLADAS.....	55
Tabela 9 - GENÓTIPO DAS ESTIRPES DE <i>E. coli</i> ISOLADAS .....	56
Tabela 10 - RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DOS AMPLICONS COM AS SEQÜÊNCIAS DE GENES DEPOSITADAS NO GENBANK .....	56

## RESUMO

As estirpes de *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) foram reconhecidas nas últimas duas décadas como agentes causadores de infecções em humanos em todo o mundo. Tem como característica a produção das toxinas Shiga codificadas pelos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e suas variantes, e a transmissão através da ingestão de água e alimentos contaminados. No Brasil foram registrados poucos casos de infecção por STEC em humanos, e no Estado do Paraná até o presente momento, nenhum caso foi evidenciado. O objetivo deste trabalho é detectar em amostras de fezes de crianças com diarreia a presença de STEC através de PCR e determinar o perfil molecular dessas estirpes. Foram analisadas 331 amostras de fezes (306 diarreicas, 25 controles saudáveis) provenientes de indivíduos com faixa etária entre 24 dias a 14 anos e residentes em diferentes localidades do Estado do Paraná. O protocolo estabelecido neste trabalho inclui cultivo em ágar MacConkey seguido da extração de DNA pelo método da fervura (OLSVIK; STROCKBINE, 1993) e PCR para STEC empregando os genes *stx* como alvo. O limite de detecção do protocolo foi de 100UFC/mL. Foi encontrada uma incidência de STEC de 1,96% na população estudada. Em apenas 3 dessas amostras foi possível isolar as estirpes de STEC, todas pertencentes ao grupo não-O157, que apresentaram os seguintes genótipos: amostra M03 - *stx*<sub>1</sub><sup>+</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>-</sup> *eae*<sup>+</sup> *hly*<sup>+</sup>, as amostras D104 e J307 apresentaram um perfil semelhante - *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup> *eae*<sup>-</sup> *hly*<sup>-</sup>.

Palavras-chave: STEC, toxina Shiga, gene *stx*, PCR, diarreia.

## ABSTRACT

In the last two decades *Escherichia coli* Shiga Toxigenic (STEC) strains were recognized worldwide as organisms capable to cause human diseases. Their common feature is the production of Shiga toxin, codified by *stx*<sub>1</sub> and *stx*<sub>2</sub> genes and its variants. Transmission occurs by ingestion of contaminated food and water. Few cases of human STEC infections were reported in Brazil, although in Paraná State, no one was described yet. The aim of this work was search for STEC in stool specimens from children with diarrhea using PCR and establish their genotype considering virulence genes. 331 stool specimens from different locations (306 patients with diarrhea, 25 healthy controls; age ranging from 24 days to 14 years) were screened for STEC by the protocol established in this work that comprises culture on MacConkey agar, DNA extraction by the boiling method (OLSVIK; STROCKBINE, 1993) and PCR using *stx* genes as targets. This protocol was able to detect until 100 CFU/mL. An incidence of 1.96% was registered among children with diarrhea. Only 3 strains of STEC were isolated, all non-O157, showing the following genotypes: specimen M03 - *stx*<sub>1</sub><sup>+</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>-</sup> *eae*<sup>+</sup> *hly*<sup>+</sup>, specimens D104 and J307 similarly - *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup> *eae*<sup>-</sup> *hly*<sup>-</sup>.

Key-words: STEC, Shiga toxin, *stx* gene, PCR, diarrhea.



## 1 INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) é um patógeno veiculado por alimentos que representa um sério problema de saúde pública em vários países (WHO, 1998). Essas bactérias têm como principal reservatório o intestino de uma variedade de animais, particularmente ruminantes, e os ambientes onde estes são mantidos (KNIGHT, 1993; FENG, 1995; WHO, 1998).

Em humanos, a infecção por STEC decorre da ingestão de alimentos e água contaminados com fezes desses animais e pode se manifestar como uma síndrome diarréica não complicada, colite hemorrágica, púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urêmica (BEERS; CAMERON, 1995; GRIFFIN; BOYCE, 1998; KUNTZ; KUNTZ, 1999; GOLDMAN; BENNETT, 2000). A morbidade e mortalidade associadas com a doença gastrointestinal causada pelas STEC tem sido capaz de sobrepujar o emprego de elevados recursos, até mesmo em países com sistemas de saúde bem desenvolvidos como Austrália, Finlândia e Estados Unidos, onerando estes sistemas por longos períodos (PATON; PATON, 1998a).

Atualmente não existe tratamento efetivo disponível para as infecções causadas por STEC, sendo o uso de antimicrobianos controverso. Vários relatos têm indicado que essas drogas provocam um agravamento do quadro clínico dos doentes e sugerem que o seu uso seja evitado (MATSUSHIRO et al., 1999; WONG et al., 2000; ZHANG et al., 2000). As medidas para prevenir o surgimento de novos casos da doença na população dependem da identificação das STEC em amostras clínicas dos doentes e da identificação da fonte de transmissão (PATON; PATON, 1998a).

A identificação das STEC é dificultada pela ausência de características bioquímicas que permitam separá-las das estirpes não-patogênicas de *E. coli* e pela existência de diversos sorotipos desses patógenos, tornando os métodos microbiológicos convencionais inadequados para sua detecção. O baixo número de organismos presentes nas fezes é outro fator que dificulta a detecção dessas bactérias. A característica comum a todas as STEC, e que permite diferenciá-las das demais *E. coli* é a produção de toxinas Shiga, o que requer a realização de testes específicos. Embora já existam várias metodologias para a detecção de STEC, poucas são

aplicáveis à rotina dos laboratórios clínicos devido à sua complexidade ou custo elevado. Atualmente a Reação em Cadeia da Polimerase é recomendada como o método de escolha para a identificação desses organismos, mas não está comercialmente disponível (PATON; PATON, 1998a; BOPP et al., 1999; KEHL, 2002).

No Brasil as STEC não são pesquisadas rotineiramente nos laboratórios de análises clínicas, e aqueles que o fazem pesquisam apenas o sorogrupo O157. Outro fator, é que embora estirpes de STEC O157:H7 já tenham sido isoladas de casos de diarreia, aparentemente esse sorogrupo não está entre os mais frequentes no país (IRINO et al., 2000; 2002; GUTH et al., 2000; 2002a). A incidência de STEC no país é desconhecida e provavelmente muitos casos de infecção provocados por este patógeno não estão sendo diagnosticados.

Uma elevada prevalência de STEC, predominantemente não-O157, foi encontrada no rebanho bovino do Paraná (FARAH et al., 2003), mas casos de infecção em humanos ainda não foram descritos no Estado. O objetivo deste trabalho é detectar a presença de STEC em amostras de fezes de crianças com diarreia no Estado do Paraná e determinar o perfil molecular dessas estirpes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*Escherichia coli* é um bacilo gram negativo da família Enterobacteriaceae que habita o trato intestinal dos seres humanos e dos animais como comensal. Mas existem várias estirpes patogênicas de *E. coli* capazes de provocar diferentes patologias, como diarreia, disenteria, síndrome hemolítico-urêmica, infecções do trato urinário, septicemia, pneumonia e meningite, associadas com estirpes específicas (NATARO; KAPER, 1998).

O perfil bioquímico e a tipagem sorológica são os sistemas utilizados para identificar as estirpes de *E. coli*. Dois componentes da superfície bacteriana formam a base para o sistema de classificação sorológica: o antígeno somático (O) e o antígeno flagelar (H). Nas bactérias capsuladas, o antígeno capsular (K) também é usado na classificação. Embora a tipagem sorológica seja amplamente utilizada e existam associações entre sorotipo e virulência, ela não é adequada, isoladamente, para caracterizar uma estirpe de *E. coli* como patogênica (SALYERS; WHITT, 1994; FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002).

O estudo do processo de patogênese em algumas estirpes de *E. coli* levou à descrição de vários genes associados com virulência presentes no genoma desses organismos mas ausentes nas estirpes não patogênicas (SALYERS; WHITT, 1994; NATARO; KAPER, 1998). Com os conhecimentos adquiridos sobre patogênese, foi proposto que os mecanismos de virulência bacterianos, tais como padrões de adesão da bactéria às células do hospedeiro, efeitos da adesão nas células do hospedeiro, produção de toxina, capacidade de invasão, entre outras, fossem empregados para diferenciar as estirpes patogênicas das comensais. Isto representa um passo promissor na identificação dos organismos patogênicos pois está mais diretamente associado com o processo de doença do que a sorologia (SALYERS; WHITT, 1994). Estas características têm sido utilizadas para designar algumas das estirpes de *E. coli* capazes de causar diarreia, entre as quais se destaca a *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC). Esse organismo é veiculado através de alimentos e pode causar um amplo espectro de doenças variando de diarreia não-complicada a colite hemorrágica, e complicações potencialmente fatais como síndrome hemolítico-urêmica (SHU). As infecções causadas por STEC e a possível evolução para

complicações graves e suas seqüelas, acarretam um alto custo econômico e social. (PATON; PATON, 1998a; ELBASHA; FITZSIMMONS; MELTZER, 2000).

## 2.1 *Escherichia coli* Shiga toxigênica

A associação de STEC com infecção em humanos ocorreu em 1982, nos Estados Unidos, durante a investigação de dois surtos de colite hemorrágica e SHU que foram associados a um sorotipo até então incomum de *E. coli* identificado como O157:H7, devido aos seus antígenos somático e flagelar (RILEY et al., 1983). Esse organismo foi denominado *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) devido às características da doença causada nos indivíduos infectados. Em 1983 ocorreu a associação dessas bactérias, que produziam uma citotoxina capaz de induzir efeitos citopáticos irreversíveis em células Vero, com casos de SHU (KARMALI et al., 1983a; 1983b). Na verdade, esse efeito foi descrito em 1977, mas naquela época não foi esclarecido se esse organismo era responsável pelos quadros de diarreia investigados (KONOWALCHUK et al., 1977). Devido ao efeito citotóxico em cultura de células Vero, foi proposta a denominação de *E. coli* produtora de toxina Vero (VTEC).

Na seqüência, O'BRIEN e colaboradores purificaram e caracterizaram a citotoxina, e verificaram que ela apresentava estrutura e atividade biológica similares à toxina Shiga (Stx) produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O'BRIEN et al., 1983). Também foi demonstrado que a toxina produzida pelas estirpes de VTEC podia ser neutralizada por anticorpos anti-Stx resultando nas designações *E. coli* "Shiga-like" toxigênica (SLTEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga e *E. coli* Shiga toxigênica (STEC). Posteriormente foram identificados dois tipos principais de toxina Shiga em *E. coli* e subseqüentemente inúmeras formas variantes (PATON; PATON, 1998a).

Atualmente a designação STEC é a mais utilizada para se referir a um grupo de *E. coli* que apresenta como característica comum a produção de toxinas Shiga. Além da *E. coli* O157:H7 existem mais de 100 sorotipos diferentes de STEC capazes de causar doenças em humanos. As últimas são geralmente designadas de STEC não-O157; têm sido isoladas em todo o mundo e predominam em vários países (BEUTIN et al., 1994; SCHMIDT; KARCH, 1996; BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER, 1998; WHO, 1998; BOERLIN et al., 1999; IRINO et al., 2000; FEY et al., 2000).

Mesmo nos países que apresentam maior incidência de STEC O157 – como Inglaterra e Estados Unidos – têm-se percebido que o número de casos devido às não-O157 é provavelmente maior do que se esperava. Estudos sugerem que cerca de 25% dos casos de SHU na América do Norte sejam devidos às STEC não-O157 (CDC, 1995; McCARTHY et al., 2001; KEHL, 2002).

As STEC têm sido associadas com inúmeros surtos e casos isolados de doença gastrointestinal em vários países, incluindo Canadá, Estados Unidos (RILEY et al., 1983; JOHNSON; LIOR; BEZANSON, 1983; SMITH et al., 1987; PAI et al., 1988; BELL et al., 1994; PROCTOR et al., 2002; CDC, 2002) Argentina, Brasil, Chile (LOPEZ et al., 1989; CÓRDOVEZ et al., 1992; RIVAS et al., 1998; CANTARELLI et al., 2000; IRINO et al., 2002), Alemanha (HUPPERTZ et al., 1996; BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER, 1998), Austrália (PATON et al., 1996), Índia (KHAN et al., 2002); Inglaterra (SMITH et al., 1987; THOMAS et al., 1994), Itália (CAPRIOLI et al., 1994; RICOTTI et al., 1994; CAPRIOLI et al., 1997), Finlândia (KESKIMÄKI et al., 1998; 2001) e Japão (HASHIMOTO et al., 1999), o que as torna um problema mundial de saúde pública.

A *E. coli* O157:H7 é o sorotipo de STEC mais comumente associado com surtos de doença gastrointestinal, e o mais estudado. O genoma de duas estirpes de STEC O157:H7 isoladas de surtos foi seqüenciado, mostrando 1,34 Mb de DNA que não está presente na estirpe *E. coli* K-12, não patogênica. Este DNA adicional está inserido ao longo da estrutura cromossômica comum como fragmentos que variam de poucas centenas de pares de base até 88 kb. Muitos contêm apenas genes de função desconhecida, alguns foram associados com funções metabólicas alternativas, e outros contêm prováveis fatores de virulência, de acordo com a homologia apresentada com genes de função já conhecida de outros microorganismos, além de profagos, e genes já descritos como aqueles presentes na ilha de patogenicidade LEE e genes que codificam as toxinas Shiga, Stx1 e Stx2 (PERNA et al., 2001; HAYASHI et al., 2001).

### 2.1.1 Diversidade entre as STEC

Existem entre as STEC diversos tipos clonais indicando considerável diversidade genética e origem evolutiva independente. As STEC são classificadas em quatro grupos designados EHEC1, EHEC2, STEC1 e STEC2, baseados na

tipagem de seqüências multilocus. O grupo EHEC1 compreende as estirpes O157, ao passo que EHEC2 inclui uma variedade de estirpes não-O157, como as dos sorogrupos O111 e O26. Os membros desse grupo compartilham os mesmos fatores de virulência das *E. coli* O157, como a ilha de patogenicidade LEE, causam doenças similares e são comuns nos bovinos, mas os dois grupos divergem substancialmente. O grupo STEC1 inclui muitos sorogrupos, geralmente associados com o antígeno flagelar H21, sendo os mais comuns O113, OX3 e O91. Os membros desse grupo também causam doenças e são comumente isolados de humanos, embora não contenham a ilha de patogenicidade LEE. O grupo STEC2 é composto pelos sorotipos O103:H2, O103:H6 e O45:H2. Pouco se sabe sobre a virulência desses organismos, mas são altamente divergentes dos demais grupos (WHITTAM, 1998).

A maioria das STEC é similar às estirpes não patogênicas de *E. coli* em termos de propriedades bioquímicas e sorológicas, gerando dificuldades para o seu diagnóstico nos laboratórios de rotina. Somente as propriedades de virulência como a produção de toxina Shiga, permitem distinguir entre as estirpes de STEC e as comensais do intestino (TSCHÄPE; FRUTH, 2001).

## **2.2 Fatores de virulência**

Existe um amplo espectro de fatores de virulência entre as STEC e uma grande variação na distribuição destes, o que pode afetar a virulência das diferentes estirpes (BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER, 1998; SCHMIDT et al., 1999; FEY et al., 2000). A produção de toxinas Shiga é a característica comum a todas as STEC (TSCHÄPE; FRUTH, 2001).

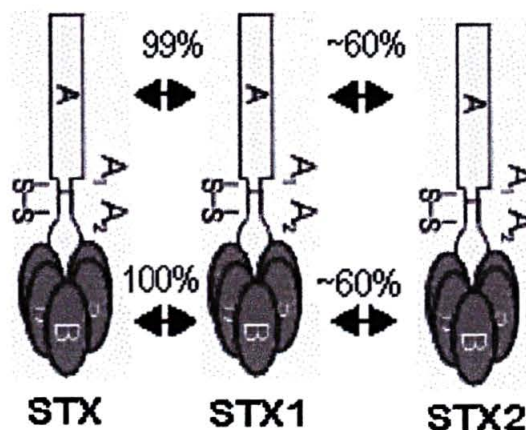
### **2.2.1 Toxinas Shiga**

As STEC são diferenciadas de outras *E. coli* pela produção de um ou dois tipos principais de potentes toxinas, denominadas toxina Shiga 1 (Stx1) e toxina Shiga 2 (Stx2). Essas toxinas são geneticamente relacionadas e apresentam atividades biológicas similares, mas são distintas antigenicamente, não ocorrendo neutralização cruzada frente a anticorpos anti-Stx1 ou anti-Stx2. As toxinas Stx1 e Stx2 são codificadas pelos genes *stx<sub>1</sub>* e *stx<sub>2</sub>*, respectivamente, que estão localizados no genoma de fagos que se integram ao cromossomo da célula hospedeira

(NEWLAND et al., 1985; STROCKBINE et al., 1986; WILLSHAW et al., 1987; CALDERWOOD et al., 1987; JACKSON et al., 1987; GOBIUS et al., 2003; RECKTENWALD; SCHMIDT, 2002). A presença desses genes em fagos propicia não somente a capacidade de disseminação entre diferentes estirpes, mas também possibilita a sua coexistência em uma mesma bactéria. Dessa maneira, as STEC podem apresentar um ou mais genes *stx*. A combinação de dois e três genes *stx* em estirpes de STEC O157 e não-O157 isoladas de humanos já foi registrada (FÜRST et al., 2000; EKLUND; SCHEUTZ; SIITONEN, 2001; EKLUND; LEINO; SIITONEN, 2002).

As toxinas produzidas pelas STEC pertencem à família das toxinas Shiga e estruturalmente pertencem ao grupo das toxinas do tipo AB, contendo uma subunidade A e cinco subunidades B (O'BRIEN; HOLMES, 1987; CALDERWOOD et al., 1987; SCHMITT; MEYSICK; O'BRIEN, 1999). A subunidade A, de 32 kDa, é composta de dois fragmentos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, ligados através de uma ponte dissulfeto. É o componente ativo da toxina e é ligada de forma não covalente a cinco unidades B idênticas, cada uma com 7,7 kDa. As subunidades B formam uma estrutura importante para a ligação da toxina aos seus receptores glicolipídicos na superfície das células.

FIGURA 1 – ESTRUTURA E SIMILARIDADE DAS TOXINAS SHIGA

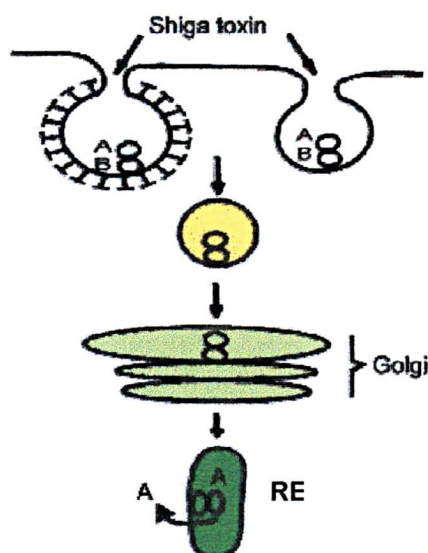


FONTE: Modificado de FAN et al., 2000 e SANDVING; van DEURS, 2002.



A interação inicial das toxinas Shiga com as células alvo ocorre através de receptores de superfície da família globotriaosilceramida - Gb3 (antígeno P<sup>k</sup>), exceto para a variante Stx2e que liga aos receptores Gb4 (antígeno P) (LINGWOOD, 1996; COOLING et al., 1998). Uma vez ligadas à membrana da célula alvo, as moléculas de toxina são internalizadas por endocitose mediada por receptor. O processo de internalização provavelmente envolve a formação de vesículas revestidas por clatrina como indicado na Figura 2 (SANVIG; van DEURS, 2000). O tráfego celular subsequente tem maior impacto sobre os efeitos biológicos da toxina. Em algumas células as vesículas se fundem com lisossomos celulares resultando na degradação da mesma. Porém em células sensíveis à toxina as vesículas são transportadas via complexo de Golgi até o retículo endoplasmático antes de serem translocadas para o citoplasma (SANVIG et al., 1994). Durante este processo a subunidade A é clivada por uma protease da membrana denominada furina liberando as subunidades A<sub>1</sub> de 27kDa, responsável pela atividade enzimática de Stx e A<sub>2</sub>, que permanecem ligadas por pontes dissulfeto. Essa ligação é subsequentemente reduzida liberando o componente A<sub>1</sub>, que apresenta atividade de RNA N-glicosidase e inibe a síntese de proteína pela remoção de uma adenina do RNAr 28S do ribossoma causando morte celular (PATON; PATON, 1998a).

FIGURA 2 - MECANISMO DE INTERNALIZAÇÃO E TRANSPORTE DAS TOXINAS SHIGA

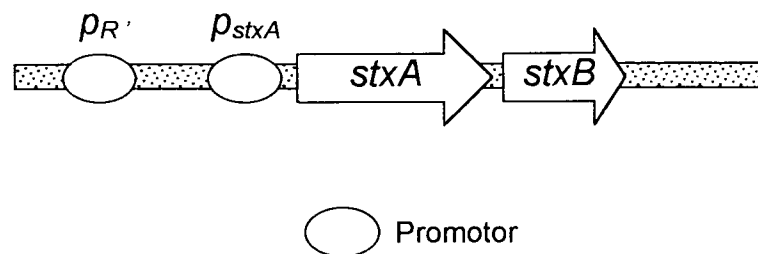


As toxinas Shiga ligam-se às células, são endocitadas e transportadas ao Complexo de Golgi e em seguida ao retículo endoplasmático quando a subunidade A é clivada enzimaticamente e A<sub>1</sub> é liberada no citosol. LEGENDA: A - subunidade A da toxina; B - subunidade B da toxina; RE - retículo endoplasmático. FONTE: adaptado de SANVIG; van DEURS, 2002.



Os genes para as subunidades A e B constituem um operon, com o gene que codifica para a subunidade A localizado à montante do gene da subunidade B. A sequência de nucleotídeos de *stx*<sub>1</sub> apresenta alta homologia (>99%) com *stx* de *Shigella dysenteriae* tipo 1, apresentando 3 substituições de nucleotídeos no gene que codifica a subunidade A de *stx*<sub>1</sub>, das quais apenas uma resultou na substituição de aminoácido. Os genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> apresentam 58% de homologia na sequência de nucleotídeos e 56% na sequência deduzida de aminoácidos (CALDERWOOD et al., 1987; JACKSON et al., 1987; STROCKBINE et al., 1988).

FIGURA 3 - ESTRUTURA DO OPERON *stx*



FONTE: Adaptado de WAGNER; WALDOR, 2002.

Substituições de nucleotídeos encontradas nas sequências de *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> em algumas estirpes de STEC levaram a descrição de formas variantes destes genes. O grupo da toxina Stx2 é altamente heterogêneo, com 26 variantes já descritas (NAKAO et al., 2002). Compreende além de Stx2 variantes como Stx2v, Stx2va, Stx2-OX3, Stx2e, Stx2d-Ount, Stx2c, Stx2d, Stx2f e Stx2g (WEINSTEIN et al., 1988; GANNON et al., 1990; SCHMITT; MCKEE; O'BRIEN, 1991; PATON; PATON; MANNING, 1993; FRANKE et al., 1995; PIÉRARD et al., 1998; FÜRST et al., 2000; SCHMIDT et al., 2000; LEUNG et al., 2003).

No grupo das toxinas Stx1 também foram descritas variantes como Stx1 CB, Stx1 O48, Stx1c e Stx1d (PATON et al., 1993a; PATON; BEUTIN; PATON, 1995; ZHANG et al., 2002; BÜRK et al., 2003). Diferenças numéricas nas sequências de Stx1, Stx2 e respectivas variantes estão indicadas na Tabela 1.

TABELA 1- SIMILARIDADE NA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS  
DOS VARIANTES DE *stx*<sub>1</sub> E *stx*<sub>2</sub>

Gene	Fonte	Seqüência de nucleotídeos (%)		Seqüência deduzida de aminoácidos (%)	
		Subunidade A	Subunidade B	Subunidade A	Subunidade B
<b><i>stx</i><sub>1</sub></b>		100	100	100	100
<i>Stx</i> <sub>1c</sub> / <i>stx</i> <sub>10x3</sub>	Zhang et al., 2002 e Paton et al., 1995	96,8	95,2	97,1	96,6
<i>stx</i> <sub>1d</sub>	Bürk et al., 2003	91,9	90,7	92,4	92,1
<i>stx</i> <sub>1048</sub>	Paton et al., 1995	99,6	99,6	99,4	100
<i>stx</i> <sub>1CB</sub>	Paton et al., 1995	99,5	100	99,4	100
<i>stx</i> <sub>1PH</sub>	Paton et al., 1993a	99,5	100	99,4	100
<b><i>stx</i><sub>2</sub></b>		100	100	100	100
<i>stx</i> <sub>2048</sub>	*	99,5	99,3	99,7	98,9
<i>stx</i> <sub>20X3b</sub>	*	99,3	95,6	99,4	96,6
<i>stx</i> <sub>2ent</sub>	*	99,2	99,6	99,1	98,9
<i>stx</i> <sub>2c</sub>	*	99,6	95,9	100	96,6
<i>stx</i> <sub>2cf</sub>	*	98,4	96,3	98,1	96,6
<i>stx</i> <sub>2d</sub>	Gobius et al., 2003	99,1	95,9	99,0	96,6
<i>stx</i> <sub>2d-0111</sub>	*	95,9	87,0	95,3	86,5
<i>stx</i> <sub>2d-Ount</sub>	*	93,8	84,4	93,8	86,5
<i>stx</i> <sub>2d-0X3a</sub>	*	96,0	84,1	95,6	85,4
<i>stx</i> <sub>2e</sub>	*	94,2	82,6	94,1	85,4
<i>stx</i> <sub>2e</sub>	*	94,3	82,6	94,1	85,4
<i>stx</i> <sub>2era</sub>	*	93,8	82,2	93,1	84,3
<i>stx</i> <sub>2f</sub>	*	67,5	78,5	69,7	80,9
<i>stx</i> <sub>2g</sub>	Leung et al., 2003	94,8	91,7	96,8	95,9
<i>stx</i> <sub>2v</sub>	*	94,3	82,6	93,1	85,4
<i>stx</i> <sub>2va</sub>	*	68,2	78,9	69,1	80,9
<i>stx</i> <sub>2vha</sub>	*	99,1	95,9	99,1	96,6
<i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	*	99,1	95,9	99,1	95,5
<i>stx</i> <sub>2vhc</sub>	*	99,2	96,3	99,1	96,6
<i>stx</i> <sub>2vhc</sub>	*	99,2	96,3	99,4	96,6
<i>stx</i> <sub>2vhd</sub>	*	99,1	95,9	99,7	96,6
AB017524	*	99,1	95,9	99,7	96,6
AB012101	*	93,9	87,0	93,8	88,8
AB012102	*	93,6	86,7	93,1	88,8
X81415	*	94,1	82,6	93,4	85,4
X81416	*	94,3	82,6	93,8	85,4
X81417	*	94,1	82,6	93,8	85,4
X81418	*	93,8	83,0	93,4	85,4

\*dados adaptados de NAKAO et al., 2002.

A produção destas toxinas é essencial para muitas das características patológicas da infecção sendo os principais fatores de virulência associados com colite hemorrágica e SHU (BOERLIN et al., 1999). A presença de Stx1 ou Stx2 está diretamente relacionada à severidade da doença e em geral, quadros clínicos mais graves têm sido relacionados com infecções causadas por STEC que expressam Stx2 (RÜSSMANN et al., 1994; BOERLIN et al., 1999; HESS; LIESKE; WEBER, 1999; DONOHUE-ROLFE et al., 2000; WEBER et al., 2003).

A presença dos genes *stx* também foi relatada em algumas estirpes de *Vibrio cholerae* O1 e não-O1, *Vibrio parahaemolyticus* (O'BRIEN et al., 1984), *Citrobacter freundii* (SCHMIDT et al., 1993; TSCHÄPE et al., 1995), *Shigella sonnei* (KEENE et al., 1994; BEUTIN; STRAUCH; FISCHER, 1999) e *Enterobacter cloacae* (PATON; PATON, 1996). Foi verificada grande instabilidade destes genes em *Enterobacter* e *Citrobacter* (TSCHÄPE et al., 1995; PATON; PATON, 1997).

### 2.2.2 Proteínas de adesão

A adesão dos organismos patogênicos aos tecidos do hospedeiro é o primeiro estágio no processo da doença infecciosa. A compreensão desse mecanismo de interação patógeno-hospedeiro pode ajudar a identificar novos alvos para terapia e estabelecer os efeitos que a adesão desencadeia sobre a célula sobre a qual aderiu. Embora dados substanciais tenham sido acumulados sobre a patogenicidade das STEC nos últimos anos, poucas informações estão disponíveis sobre os mecanismos de adesão utilizados por esses organismos.

#### 2.2.2.1 Intimina

A intimina é produto do gene *eaeA*, localizado em uma ilha de patogenicidade denominada LEE (*locus for enterocyte effacement*), descrito inicialmente no cromossomo de EPEC e pouco tempo depois na estirpe O157 de STEC. Além de *eaeA*, essa região contém outros genes associados com virulência e alguns de função ainda desconhecida (MCDANIEL et al., 1995; PERNA et al., 1998).

Algumas estirpes de STEC produzem a intimina o que as torna capazes de aderir fortemente aos enterócitos. Esse processo culmina com a formação de lesões do tipo A/E (*attaching and effacing*) nos enterócitos, caracterizadas por mudanças na estrutura da célula, degeneração das microvilosidades e a íntima adesão da bactéria

à superfície intestinal. Abaixo do sítio de adesão, ocorre acúmulo de componentes do citoesqueleto, resultando na formação de estruturas em pedestal (MCDANIEL et al., 1995; FRANKEL et al., 1998). A presença simultânea de *eae* e *stx*<sub>2</sub> tem sido associada com doença severa (BOERLIN et al., 1999; WERBER et al., 2003).

#### 2.2.2.2 Saa

A adesina Saa (STEC *autoagglutinating adhesin*) foi caracterizada recentemente na estirpe O113:H21 98NK2 isolada de um surto de SHU. Essa bactéria não contém a ilha de patogenicidade LEE. O gene *saa* foi localizado em um megaplasmídeo, cuja eliminação resultou na redução da aderência da bactéria. Aliado a isso, foi verificado que a presença de *saa* provocou o aumento da aderência de *E. coli* JM109 às células HEp-2. Homólogos de *saa* também foram descritos em outras estirpes de STEC LEE negativas, isoladas de casos SHU ou diarreia, mas em nenhuma das portadoras da ilha de patogenicidade LEE analisadas (PATON et al., 2001; JENKINS et al., 2003).

#### 2.2.2.3 Outras proteínas de adesão

Recentemente outros genes associados com adesão foram descritos em estirpes de STEC, entre eles o gene *iha* (*IrgA homologue adhesin*). A proteína Iha foi isolada de *E. coli* O157:H7 e é estruturalmente diferente de outras adesinas conhecidas. Iha é uma proteína de membrana externa cujos domínios são voltados para o exterior da célula. O seu papel na patogênese de *E. coli* O157:H7 ainda não foi definido mas ela conferiu fenótipo de aderência para estirpes de *E. coli* que não apresentam essa característica (TARR et al., 2000).

Outra proteína de membrana externa de *E. coli* O157:H7, OmpA, também foi associada com aderência às células HeLa, além de vários fatores que atuam no controle do processo de adesão (TORRES; KAPER, 2003). Recentemente também foi associado com o processo de adesão, o operon *lpfABCC'DE* identificado em outra região do cromossomo de *E. coli* O157:H7. Quando introduzido em uma estirpe não-fimbriada de *E. coli* levou à produção de fímbrias e aderência em cultivos celulares. Foi proposto que estas fímbrias participam na interação entre *E. coli* O157:H7 e as células eucarióticas auxiliando na formação de microcolônias (TORRES et al., 2002).

Genes *lpf* isolados da estirpe O113:H21 e encontrados em outras estirpes de STEC, LEE positivas ou negativas, também foram implicados no processo de adesão (DOUGHTY et al., 2002).

### 2.2.3 Fatores de virulência acessórios

Além das toxinas Shiga e da ilha de patogenicidade LEE que estão associados com a patogenicidade das STEC, plasmídeos de virulência também podem afetar as propriedades desse grupo de patógenos. O plasmídeo pO157, de 92 kb, é encontrado na maioria das estirpes O157:H7 de STEC e contém vários genes associados com virulência (BURLAND et al., 1998).

A produção de enterohemolisinas pelas STEC, por exemplo, está associada com o plasmídeo pO157. Essa característica é codificada pelo gene *hlyA* e tem sido associada com maior severidade da doença, mas a maneira como contribui para a patogênese da STEC ainda não é bem compreendida. Uma possibilidade é que a hemoglobina liberada por sua ação sobre os eritrócitos sirva como fonte de ferro, estimulando o crescimento desse patógeno no intestino (KARCH; SCHMIDT; BRUNDER, 1998; NATARO; KAPER, 1998).

Outros prováveis genes de virulência encontrados no pO157 incluem os que codificam para a enzima bifuncional catalase peroxidase KatP e para a serina protease EspP. A produção da EspP foi relacionada com a exacerbação da hemorragia, já que ela é capaz de clivar o fator de coagulação V *in vitro* (KARCH; SCHMIDT; BRUNDER, 1998).

As estirpes não-O157 freqüentemente contém megaplasmídeos que contém *hly* e outros genes de virulência acessórios. Mas ao contrário do pO157, estes apresentam alta variabilidade em relação à sua composição gênica (SCHMIDT; KARCH, 1996; BRUNDER et al., 1999).

Um outro fator, de origem cromossomal, que pode contribuir para a patogênese da diarreia aquosa verificada nos estágios iniciais da infecção, é a produção de uma enterotoxina estável ao calor denominada EAST1 que provavelmente atua na secreção intestinal de água e eletrólitos agindo sobre o modulador fisiológico de sinalização intracelular cGMP (FASANO, 1997).

Além da capacidade de aderir às células do epitélio intestinal e colonizar o intestino humano, a resistência ao pH ácido do estômago também é uma

característica importante para a virulência das STEC, pois permite que estes organismos sejam capazes de desencadear doença mesmo quando presentes em baixo número no alimento contaminado. Essa característica de resistir ao pH ácido foi relacionada à introdução de ração rica em grãos na alimentação do gado, o que é responsável por baixar o pH do cólon devido aos ácidos produzidos na fermentação. Nesses animais as STEC acabam adquirindo resistência aos ácidos além de serem encontradas em maior quantidade (COUZIN, 1998; DIEZ-GONZALEZ et al., 1998).

### **2.3 Fontes de transmissão**

As STEC são encontradas no intestino de animais aparentemente saudáveis, principalmente no gado bovino, e nos ambientes onde estes são mantidos (KNIGHT, 1993; FENG, 1995; WHO, 1998). A colonização do trato intestinal do gado bovino pelas STEC e o contato acidental da carne com o conteúdo intestinal do animal durante o abate provavelmente é responsável pela disseminação da bactéria (SALYERS; WHITT, 1994).

Os casos de infecção por STEC geralmente estão associados com o consumo de carne mal cozida, leite não pasteurizado e derivados contaminados. Consumo de água, vegetais frescos e produtos de origem vegetal industrialmente processados como sucos, maionese e iogurtes contaminados com STEC também foram implicados nos surtos. A associação com alimentos industrializados sugere que os avanços tecnológicos na indústria de processamento de alimentos eventualmente acabam contribuindo para a disseminação dessas doenças, como ocorre na produção em massa de hambúrgueres, sucos e outros, onde pequenas quantidades do alimento contendo STEC acabam contaminando porções maiores do produto final (BERKELMAN, 1997). A resistência das STEC às condições desfavoráveis do meio e a baixa dose de infectividade também são fatores que contribuem para a sua habilidade em causar doenças veiculadas por alimentos (DIEZ-GONZALEZ et al., 1998).

A transmissão pessoa a pessoa também foi documentada (GILLIGAN et al., 1992; BESSER et al., 1993; FENG, 1995; WHO, 1998).

## 2.4 Manifestações clínicas da infecção por STEC

As STEC estão associadas com um amplo espectro de doenças, que inclui síndrome diarréica não complicada, geralmente com cólicas abdominais e sem febre ou febre em baixo grau, colite hemorrágica e SHU. Outras manifestações clínicas como púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), ataxia, convulsões e morte podem advir da infecção por STEC (TZIPORI; CHOW; POWELL, 1988; GILLIGAN et al., 1992; RICOTTI et al., 1994; KUNTZ; KUNTZ, 1999; GOLDMAN; BENNETT, 2000). Também foram descritos alguns casos de infecções do trato urinário, seguidos ou não de SHU, causados pelos sorotipos O17:H18, O103:H2, O145:H28 e OX3:H2 de STEC (TARR et al., 1996; EKLUND; SCHEUTZ; SIITONEN, 2001).

### 2.4.1 Colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica

A colite hemorrágica se apresenta tipicamente com cólicas abdominais e diarreia aquosa seguida por emissões hemorrágicas, está presente em 35 a 90% dos casos de infecção por STEC (JOHNSON; LIOR; BEZANSON, 1983; KARMALI et al., 1983a; 1983b; O'BRIEN et al., 1983; GILLIGAN et al., 1992). Complicações podem ocorrer em pacientes de qualquer faixa etária e aproximadamente 10% dos afetados com diarreia e colite hemorrágica desenvolvem a SHU (WHO, 1998), mas nem todos os casos de SHU são precedidos por diarreia (RONDEAU; PERALDI, 1996).

A SHU é caracterizada pelo desenvolvimento de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, insuficiência renal e manifestações do sistema nervoso central. Essas manifestações têm início brusco e ocorrem tipicamente uma semana depois do aparecimento da diarreia sanguinolenta (GILLIGAN et al., 1992), oligúria grave, edema, hematúria, e em alguns pacientes, alterações neurológicas proeminentes. A hipertensão está presente em 50% dos pacientes (ROBBINS et al., 1996).

A SHU pode afetar pessoas de todas as faixas etárias, mas crianças e idosos parecem ser mais suscetíveis o que pode ser consequência da imaturidade do sistema imune das crianças e do declínio da função deste nos idosos (CARTER et al., 1987; PAVIA et al., 1990; GILLIGAN et al., 1992; ROBBINS et al., 1996). A SHU é a principal causa de insuficiência renal aguda em crianças. Com o aperfeiçoamento das técnicas de diálise renal e de suporte clínico, a mortalidade

associada à SHU foi reduzida de 50% para menos de 10% nas duas últimas décadas. Cerca de 30% dos sobreviventes desenvolve seqüelas permanentes que incluem insuficiência renal crônica, hipertensão e deficiências neurológicas causadas pela infecção por STEC (ROBBINS et al., 1996; PATON; PATON, 1998a).

A TTP pode apresentar-se como uma variação da SHU que ocorre mais comumente em adultos. Inclui todas as características da SHU, embora o dano renal seja menos severo e o envolvimento neurológico mais proeminente. Outros mecanismos patológicos provavelmente estão envolvidos, uma vez que nem todas as mortes de pacientes infectados com STEC são explicadas por complicações como a TTP ou SHU (GRIFFIN; BOYCE, 1998; PATON; PATON, 1998a).

Ainda não há tratamento efetivo ou profilaxia disponível para as infecções causadas por STEC. Alternativas promissoras são a terapia com anticorpos monoclonais para neutralizar a atividade das toxinas Stx1 e Stx2 (YAMAGAMI et al., 2001; MUKHERJEE et al., 2002a; 2002b), e o Synsorb-Pk, um oligossacarídeo associado a uma matriz inerte, capaz de absorver as toxinas produzidas por STEC presentes no lúmen (ARMSTRONG et al., 1995).

A administração de antibióticos aos pacientes infectados é controversa. Aparentemente o uso de antibióticos aumenta o risco para desenvolvimento de SHU por estimular a produção da toxina Shiga e torná-la mais disponível para absorção (KIMMITT; HARWOOD; BARER, 1999; MATSUSHIRO et al., 1999; KIMMITT; HARWOOD; BARER, 2000; ZHANG et al., 2000). Também não se recomenda o uso de drogas antimotilidade ou opiáceos devido a sua associação com complicações e o prolongamento dos sintomas (CIMOLAI et al., 1990; WONG et al., 2000).

Como não há tratamento específico, as medidas preventivas baseadas na compreensão da epidemiologia das infecções por STEC são necessárias. Essas dependem da disponibilidade de procedimentos rápidos, sensíveis e simples para a detecção de STEC em amostras humanas e alimentos (KARCH et al., 1999).

## **2.5 Patogênese da infecção**

Após a ingestão, as STEC mesmo em pequenas quantidades são capazes de sobreviver ao ambiente desfavorável do estômago, aderir aos enterócitos através de fímbrias e então, se ligar mais firmemente através das proteínas de adesão como intimina e Iha, e competir com os microorganismos para estabelecer a colonização



intestinal (TSCHÄPE; FRUTH, 2001). O período de incubação pode variar de 1 a 10 dias (GILLIGAN et al., 1992; TARR, 1998).

As STEC não são invasivas, ligam-se à mucosa do intestino e ativam mecanismos de defesa do hospedeiro induzindo inflamação intestinal. A secreção de toxinas na luz intestinal pode ter algum papel na inibição do crescimento da flora comensal além de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias dos macrófagos amplificando potencialmente a inflamação intestinal induzida pela bactéria (O'LOUGHLIN; ROBINS-BROWNE, 2001).

A ligação da toxina aos receptores Gb3 desencadeia a captação e transporte ao retículo endoplasmático levando à translocação da subunidade A ao citoplasma onde provoca a inibição da síntese de proteínas. Stx também ativa processos celulares que culminam com a apoptose em células epiteliais e endoteliais.

A patofisiologia da lesão gastrointestinal e a evolução da doença de gastroenterite à SHU são processos complexos, ainda não completamente esclarecidos, e envolvem fatores bacterianos e do hospedeiro, além do papel desempenhado pelas toxinas (O'LOUGHLIN; ROBINS-BROWNE, 2001).

A diarreia pode ser decorrente da ligação das toxinas Shiga às células epiteliais absorptivas maduras com a conseqüente morte celular e inibição da absorção do conteúdo intestinal (O'BRIEN; HOLMES, 1987).

A translocação da toxina produzida no lúmen intestinal para os tecidos adjacentes e então para a corrente sangüínea pode ocorrer através das células epiteliais, da lesão da mucosa causada pelos efeitos diretos da toxina, bem como da intimina sobre as junções *gap* em células epiteliais adjacentes (ACHESON et al., 1996). A inflamação intestinal torna a barreira mucosa mais permeável o que pode aumentar a captação das toxinas. As toxinas circulantes ligam-se aos receptores das células endoteliais e macrófagos, provocando lesões nas células endoteliais, aumento da aderência dos leucócitos ao endotélio e o início de um ciclo que ativa elementos pró-trombóticos levando a trombose em vasos pequenos e médios. A toxicidade é aumentada pela liberação local e sistêmica de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , que aumenta a expressão dos receptores Gb3 aumentando a ligação das toxinas às células sensíveis. O infarto da mucosa intestinal produz sangramento no intestino e diarreia hemorrágica.

As toxinas circulantes danificam órgãos, como rins e cérebro, ligando-se às células endoteliais e induzindo microangiopatia trombótica. O depósito de fibrina na microcirculação produz dano mecânico nos eritrócitos resultando em anemia hemolítica, enquanto que a trombose disseminada nos vasos pequenos causa trombocitopenia (O'LOUGHLIN; ROBINS-BROWNE, 2001).

## 2.6 Diagnóstico laboratorial das infecções causadas por STEC

O diagnóstico laboratorial das infecções causadas por STEC é dificultado pelo rápido declínio do número de microorganismos excretados nas fezes poucos dias após o início dos sintomas gastrointestinais e pela diversidade bioquímica e sorológica desse grupo de bactérias (KARCH et al., 1999).

### 2.6.1 Métodos microbiológicos

Como a O157:H7 foi a primeira STEC identificada, suas características de ausência de fermentação do sorbitol em 24 horas e ausência de produção de  $\beta$ -glucuronidase, foram utilizadas para diferenciá-la das demais estirpes de *E. coli*. O primeiro meio de cultura utilizado para o diagnóstico da O157 foi o ágar MacConkey Sorbitol, onde essa bactéria cresce formando colônias incolores – distintas da maioria das outras estirpes de *E. coli* que formam colônias avermelhadas. As colônias incolores devem ser analisadas frente ao antisoro anti-O157 e capacidade de produzir toxina Shiga, uma vez que outros organismos como *Proteus*, *Providencia*, *Hafnia*, *Enterobacter* e *Escherichia hermannii* também não fermentam o sorbitol e a última compartilha epítomos comuns com o antígeno O157 (GILLIGAN et al., 1992; STROCKBINE et al., 1998; KARCH et al., 1999; KONEMAN et al., 1997; BOPP et al., 1999). É um meio de cultura ainda amplamente utilizado nos laboratórios.

Variantes desse meio de cultura como o ágar MacConkey Sorbitol acrescido de cefixime e ramnose ou telurito foram desenvolvidos visando tornar o meio mais seletivo para as STEC O157 (DE BOER; HEUVELINK, 2000) mas aparentemente seu uso não apresentou vantagens sobre o meio original (STROCKBINE et al., 1998).

Com a descrição da existência de mais de 100 sorotipos diferentes de STEC capazes de provocar doença e a emergência de variantes fenotípicas do sorotipo

O157:H7 capazes de fermentar o sorbitol (FRATAMICO; BUCHANAN; COOKE, 1993; OJEDA et al., 1995; WHO 1998), a detecção dessas bactérias baseada apenas nos métodos microbiológicos tradicionais tornou-se praticamente inviável, uma vez que o diagnóstico microbiológico das STEC não-O157 é complicado pela ausência de propriedades bioquímicas que permitam diferenciá-las das estirpes de *E. coli* da microbiota intestinal, e pela grande diversidade de sorotipos. Outro fator relevante é que a caracterização do sorogrupo não indica necessariamente que o organismo produz as toxinas Shiga (KARCH et al., 1999; FENG, 1995; FEY et al., 2000).

A inabilidade da STEC O157 em produzir  $\beta$ -glucuronidase foi utilizada no desenvolvimento de meios cromogênicos como o ágar Rainbow, mas aparentemente o meio não teve um bom desempenho requerendo testes adicionais para a detecção e identificação das STEC (KEHL, 2002).

Outros métodos para o diagnóstico das infecções causadas por STEC incluem ensaios biológicos, imunológicos ou moleculares.

#### 2.6.2 Ensaios biológicos

As toxinas Shiga produzem efeitos citopáticos característicos em células Vero e HeLa. Os ensaios que incorporam a neutralização da atividade citotóxica com anticorpos toxina-específicos são métodos sensíveis e específicos para o diagnóstico das infecções causadas por STEC. A descrição de formas variantes de Stx2 que apresentam atividade reduzida ou ausente sobre células HeLa tornou as células Vero a linhagem de escolha para o diagnóstico de STEC. Embora essa linhagem seja sensível às toxinas descritas, elas variam na sensibilidade às formas variantes de Stx2 (STROCKBINE et al., 1998; KARCH et al., 1999). Esse método pode ser aplicado a filtrados de fezes, extratos de cultivos, colônias isoladas. É bastante sensível, mas demorado, trabalhoso e requer cultivo celular o que o torna pouco prático para os laboratórios de rotina (KARCH et al., 1999).

#### 2.6.3 Ensaios imunológicos

Os métodos mais frequentemente utilizados para a detecção de STEC incluem a separação imunomagnética e imunoensaios enzimáticos.

A separação imunomagnética é uma técnica de concentração e separação baseada em imunocaptura, inclui a ligação imunológica (captura) seguida pela separação física dos organismos alvo a partir de uma cultura mista resultando na concentração dos organismos pesquisados. As amostras são misturadas com partículas recobertas com anticorpos para O157. Os organismos que apresentam o antígeno O157 se ligam às partículas imunomagnéticas que são separadas através de um campo magnético, lavadas e plaqueadas em meio de cultura (DE BOER; HEUVELINK, 2000). É um método caro e sensível para o isolamento de *E. coli* O157, mas não detecta as STEC não-O157 (KARCH et al., 1996).

Vários imunoensaios enzimáticos para a detecção de Stx foram descritos. São fáceis de realizar, não requerem equipamento especializado, mas apresentam custo elevado. Frequentemente são utilizados extratos de culturas puras incubadas em presença de polimixina B, uma vez que parte das toxinas está associada às células. O kit Premier EHEC, da Meridian Diagnostics, pode ser aplicado diretamente ao material fecal ou a cultura em caldo. Utiliza anticorpos monoclonais anti-Stx1 e anti-Stx2 para capturar as toxinas e anticorpo policlonal anti toxinas Stx1 e Stx2 marcados com peroxidase para detectar a toxina ligada. Parece ser sensível e específico, mas não é capaz de detectar a variante Stx2e e produz falsos-positivos com *Pseudomonas aeruginosa* (STROCKBINE et al., 1998; KEHL, 2002).

Outro ensaio imunológico é a aglutinação passiva reversa empregada no kit VTEC-Screen, produzido pela Denka Seiken. Emprega tratamento dos isolados com polimixina B para liberar as toxinas e caolin para remover reações inespecíficas. É realizado com culturas. É sensível e específico para Stx1 e Stx2, mas reage fracamente ou não reage com variantes de Stx2 como Stx2d-Ount, Stx2e e Stx2ev (BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER, 2002).

Apesar dessas limitações esses ensaios podem detectar estirpes de STEC de outros sorogrupos além do O157, o que os torna vantajosos sobre o ágar MacConkey Sorbitol.

#### 2.6.4 Ensaio moleculares

Ensaio baseado na hibridização de colônias e na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram desenvolvidos para o diagnóstico de STEC embora não estejam comercialmente disponíveis. Os primeiros baseiam-se na utilização de

sondas para os genes *stx* ou outros genes de virulência, e têm sido utilizados para detectar e isolar STEC de culturas mistas de fezes ou colônias isoladas (WILLSHAW et al., 1987). São eficientes, mas trabalhosos, e inadequados à rotina laboratorial.

A PCR é o método molecular mais utilizado para a triagem de amostras clínicas para STEC. Os métodos de triagem e isolamento devem ser baseados na detecção dos genes que codificam as toxinas Shiga, única característica comum a todas as STEC. As vantagens da PCR incluem a especificidade, sensibilidade e rapidez na execução em relação aos métodos tradicionais (GILLIGAN et al., 1992; KARCH et al., 1999; TANG; PERSING, 1999).

Os protocolos para a detecção dos genes *stx* são baseados em duas estratégias diferentes. Uma utiliza um único par de iniciadores para amplificar a sequência localizada entre as regiões conservadas dos genes *stx* (LIN et al., 1993, citado em BASTIAN; CARLE; GRIMONT, 1998<sup>1</sup>; PATON et al., 1993b). Estes protocolos permitem a detecção de todos os genes *stx* em uma única reação. A outra abordagem utiliza diferentes pares de iniciadores para amplificar as sequências específicas para *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e seus variantes (OLSVICK; STROCKBINE, 1993). A PCR pode ser realizada com extratos brutos de culturas de fezes, extratos de colônias isoladas, ou diretamente de extratos fecais - que podem afetar o resultado do ensaio pela presença de inibidores da *Taq* DNA polimerase (GREENFIELD; WHITE, 1993; MONTEIRO et al., 1997).

## 2.7 STEC no Brasil

No Brasil a incidência das doenças provocadas por estirpes de STEC é desconhecida. Estudos realizados na década de 90 sobre agentes causadores de diarreia ainda não incluíam a STEC (ANDRADE; MOREIRA; FAGUNDES-NETO, 2000). Embora atualmente alguns laboratórios de análises clínicas tenham incorporado à sua rotina o ágar MacConkey Sorbitol sabe-se que esse meio apresenta baixa sensibilidade para a detecção de STEC (KEHL, 2002).

Apesar desse panorama, a presença de STEC no país tem sido relatada por alguns pesquisadores. Estirpes de STEC já foram isoladas em rebanhos bovinos

---

<sup>1</sup> BASTIAN, S.N.; CARLE, I.; GRIMONT, F. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.**, v. 149, p. 457-472, 1998.

aparentemente saudáveis (CERQUEIRA et al., 1999; SILVA, 2002), com alta prevalência (CERQUEIRA et al., 1999; FARAH et al., 2003; IRINO et al., 2003). Embora o sorotipo O157:H7 tenha sido isolado, o predomínio é das STEC não-O157, sendo os sorotipos mais frequentes O113:H21, O79:H14, O98:H17, O88:H25, O77:H18 e O82:H8 (FARAH et al., 2003; IRINO et al., 2003; GUTH et al., 2003b).

Considerando as infecções causadas por STEC em humanos, o primeiro relato de STEC isolada de um caso de SHU foi feito por GUTH e colaboradores (2002b), que identificaram uma estirpe de *E. coli* sorotipo O26:H11 produtora de Stx1, entero-hemolisina e intimina. Mas aparentemente casos de SHU não são comuns no país. Também não há relatos de surtos associados com STEC e os isolados têm sido identificados em casos esporádicos de diarreia ou diarreia hemorrágica. No Rio Grande do Sul o sorotipo O91:H21 foi isolado de uma criança com diarreia (CANTARELLI et al., 2000), outras estirpes de STEC foram isoladas no estado de São Paulo e pertenciam aos seguintes sorotipos: O111:NM (10 estirpes), O111:H8 (7 estirpes), O111:H11, O26:H11, O55:H6, O119:H6 (IRINO et al., 2000); O157:H7 (3 estirpes; IRINO et al., 2002), O77:H18, O103:H2 (3 estirpes), O118:H16 e ONT:H2 (GUTH et al., 2003b).

## **2.8 Objetivos**

### **2.8.1 Objetivo geral**

Detectar a presença de STEC em amostras de fezes de crianças com diarreia e caracterizá-las a nível molecular.

### **2.8.2 Objetivos específicos**

Estabelecer um protocolo de PCR custo efetivo para a triagem de amostras fecais quanto à presença de STEC.

Isolar e caracterizar bioquimicamente as estirpes de STEC.

Pesquisar os genes de virulência *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *hlyA*, *eaeA* nas estirpes de STEC.

Estimar a incidência de STEC na população analisada.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostra**

##### **3.1.1 Descrição da amostra**

Durante o período de outubro de 2002 a novembro de 2003 foram analisadas 306 amostras de fezes de crianças com diarreia, procedentes de Almirante Tamandaré, Araucária, Curitiba, Colombo, Enéas Marques, Lapa, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Paranaguá, Piraquara, Rio Branco do Sul, São José dos Pinhais, Umuarama e Telêmaco Borba. Também foram analisadas 25 amostras de fezes de crianças, procedentes das mesmas localidades, que não apresentavam diarreia, as quais foram consideradas como o grupo controle saudável.

A idade da população estudada variou de 24 dias a 14 anos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR sob o número 062EXT016/2002-10 (Anexo 1).

##### **3.1.2 Coleta e transporte**

As amostras de fezes analisadas nesse estudo foram obtidas nos seguintes hospitais e laboratórios de Curitiba: Laboratório Central do Estado (LACEN), Hospital de Clínicas da UFPR (HC), Hormocentro, Laboratório Caboracy Kosop, Laboratório do Hospital Pequeno Príncipe (LHPP), Champagnat Laboratório de Análises Clínicas e Laboratório de Parasitologia da UFPR.

O procedimento utilizado para coleta e transporte das amostras foi realizado de acordo com LEW e colaboradores (1990), com exceção das amostras provenientes do Laboratório de Parasitologia da UFPR. As amostras foram coletadas e transportadas em frascos estéreis contendo meio de transporte Cary-Blair e mantidas à temperatura ambiente até o momento da inoculação. Em caso de demora superior a 4 horas, as amostras foram refrigeradas até o momento da cultura.

As amostras obtidas no Laboratório de Parasitologia da UFPR foram coletadas em frascos limpos e secos e transportadas sob refrigeração. O intervalo entre a coleta dessas amostras e a cultura variou de 24 a 96 horas.

### 3.2 Bactérias utilizadas como controles

As características relevantes e a procedência das bactérias utilizadas como controles estão indicadas na Tabela 2. Um estoque dessas bactérias foi mantido em TSB/glicerol 50% a -20°C.

TABELA 2 – BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO CONTROLES

Organismo	Genótipo	Procedência
STEC O157:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> , <i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <i>eaeA</i> <sup>+</sup>	IAL <sup>1</sup>
STEC O111:H8	<i>stx</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> , <i>eaeA</i> <sup>+</sup> , <i>hlyA</i> <sup>+</sup>	IAL
STEC O157:H7	<i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <i>eaeA</i> <sup>+</sup>	IAL
STEC O157	<i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <i>eaeA</i> <sup>+</sup> , <i>hlyA</i> <sup>+</sup>	LACEN <sup>2</sup>
<i>E. hermannii</i>	<i>stx</i> <sup>-</sup>	IAL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>stx</i> <sup>-</sup>	adquirida comercialmente

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz – SP

<sup>2</sup> Laboratório Central do Estado – PR, estirpe isolada de bovinos

### 3.3 Reagentes

Os reativos empregados neste trabalho estão listados no Anexo 2.

### 3.4 Condições de Cultivo

Exceto quando descrito de outro modo, as culturas de fezes e dos organismos controle foram realizadas em ágar MacConkey e incubadas por 18 a 24 horas a 36 ± 1°C.

### 3.5 Extração de DNA

Três metodologias de extração de DNA foram inicialmente utilizadas visando selecionar a mais adequada para estabelecer o protocolo de triagem para STEC. A performance das metodologias de extração foi verificada empregando os respectivos produtos na PCR utilizando como alvo os genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>.



Foram empregados nesse estudo comparativo, amostras fecais de indivíduos saudáveis. Aliquotas dessas amostras foram artificialmente contaminadas com STEC e processadas pelas três metodologias de extração de DNA descritas abaixo.

### 3.5.1 Extração de DNA genômico segundo PATON

As amostras fecais foram inoculadas em TSB e incubadas por quatro a 18h, dependendo do horário do recebimento da amostra, a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Uma alíquota de 1mL de cada cultura foi centrifugada a 14000rpm durante 1min, e o precipitado ressuspensão em Tris-HCl 50mM pH 8,0, acrescido de 5 $\mu\text{L}$  de lisozima 10mg/mL - EDTA 200mM pH 8,0 e incubado por 30min a  $37^\circ\text{C}$ . Foram então adicionados 3 $\mu\text{L}$  de proteinase K 20mg/mL, seguido de incubação a  $65^\circ\text{C}$  por 1h e então fervura por 20min. Após o resfriamento da mistura, foram acrescidos dois volumes de etanol para a precipitação do DNA e o tubo foi mantido a  $-20^\circ\text{C}$  por 30min, e então centrifugado a 14000rpm por 15min. O precipitado foi seco e dissolvido em 100 $\mu\text{L}$  de água ultra-pura estéril e mantido a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso (PATON et al., 1993b).

### 3.5.2 Extração de DNA genômico segundo OLSVIK e STROCKBINE

As amostras fecais foram inoculadas em ágar MacConkey ou TSA e incubadas em aerobiose por 18 a 24h a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Uma porção de região primária de crescimento foi suspensa em 0,5mL de água destilada estéril e submetida à fervura por 20min para liberação do DNA. Após o resfriamento, o material foi centrifugado por 1min a 14000rpm e o sobrenadante transferido para outro tubo e mantido a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso (OLSVIK; STROCKBINE, 1993).

### 3.5.3 Extração de DNA genômico segundo AUSUBEL

As amostras fecais foram cultivadas como descrito no item 3.5.1. Uma alíquota de 1,5mL das culturas realizadas em TSB foram centrifugadas a 14000rpm por 1min. O precipitado foi ressuspensão em 567 $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0) e adicionado de 30 $\mu\text{L}$  de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10% e 3 $\mu\text{L}$  de proteinase K 20mg/mL. A mistura foi homogeneizada e então incubada durante 1h a  $37^\circ\text{C}$ . Após este período foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de NaCl

5M e 80µL da solução CTAB/NaCl (CTAB 10% - NaCl 0,7M) e a mistura incubada por 10 min a 65°C. Após este período foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) sendo a mistura homogeneizada e centrifugada a 14000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e foi homogeneizado e centrifugado a 14000rpm por 5min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado de 0,6 volumes de isopropanol para precipitar o DNA. Após homogeneização e a centrifugação a 14000rpm durante 15min, o precipitado foi tratado com 1mL de etanol 70% e centrifugado a 14000rpm durante 5min. O sobrenadante foi desprezado, o DNA seco e então dissolvido em 100µL de água ultra-pura estéril e mantido a -20°C até o momento do uso (AUSUBEL et al., 1999).

### 3.6 PCR

#### 3.6.1 PCR para triagem de STEC através da amplificação dos genes *stx*

As condições para a realização da PCR foram estabelecidas seguindo as recomendações de DIAFFENBACH e DVEKSLER (1995). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de STEC foi determinada através da captura das seqüências dos genes *stx* disponíveis no banco de dados GenBank – (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) e do alinhamento das mesmas empregando-se o programa Clustal X 1.8 (JEANMOUGIN, 1998).

Nas reações de PCR foram utilizados: um controle positivo (DNA extraído da *E. coli* O157:H7), um controle negativo (DNA extraído da *E. coli* ATCC 25922) e um tubo contendo todos os reativos menos DNA. As reações de amplificação foram realizadas em Termociclador Hybaid OmniGene

#### 3.6.2 PCR Multiplex para amplificação dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA* e *hlyA*

As estirpes de STEC isoladas neste trabalho foram analisadas quanto à presença dos genes de virulência *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA* e *hlyA* através do protocolo de PCR Multiplex proposto por PATON e PATON (1998b). A seqüência dos iniciadores está descrita na Tabela 3.

Quatro microlitros dos extratos de DNA obtidos como descrito no item 3.5.2 foram utilizados para reação de PCR realizada em um volume final de 50µL. A

mistura de reação continha 2,5U de *Taq* DNA Polimerase, Tampão da *Taq* 1X,  $MgCl_2$  1,5mM, 300nM de cada iniciador e dNTP 200 $\mu$ M. O seguinte programa foi utilizado: 1 ciclo a 94°C por 5min; 10 ciclos de 94°C por 1min, 65°C por 1min e 72°C por 1min. Após esses ciclos a temperatura de anelamento foi reduzida em 1°C por ciclo até 60°C; e então foram realizados mais 20 ciclos de 94°C por 1min, 60°C por 1min e 72°C por 1min.

TABELA 3 – INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO MULTIPLEX DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Gene alvo/ iniciador	Seqüência (5' – 3')	Amplicon (pb)
<i>stx</i> <sub>1</sub> F	ATAAATCGCCATTCTGTTGACTAC	180
<i>stx</i> <sub>1</sub> R	AGAACGCCCCACTGAGATCATC	
<i>stx</i> <sub>2</sub> F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255
<i>stx</i> <sub>2</sub> R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
<i>eaeA</i> F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384
<i>eaeA</i> R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
<i>hlyA</i> F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
<i>hlyA</i> R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	

### 3.6.3 Detecção dos produtos de PCR

A detecção dos produtos da reação de PCR foi realizada em gel de agarose a 2% utilizando como tampão o Tris-Borato EDTA, pH 8.0, 1X concentrado (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989; AUSUBEL et al., 1999). A separação eletroforética foi realizada em sistema de eletroforese horizontal (Horizon 58, Life Technologies) a 36V durante 1 hora e 30 min. Como controles de corrida foram utilizados os corantes azul de bromofenol e xileno cianol. Os géis foram corados em brometo de etídio 0,5 $\mu$ g/mL, visualizados em transiluminador ultravioleta (Ultralum) e a imagem capturada pelo sistema Kodak Digital Science 1D.

### 3.7 Limite de detecção do protocolo para triagem de STEC

O limite de detecção do protocolo proposto neste estudo foi avaliado empregando suspensões de STEC de concentrações conhecidas. Colônias de STEC O157:H7 foram suspensas em 1mL de água ultra-pura estéril até obter turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A partir desta suspensão foram realizadas diluições seriadas, cujas concentrações foram verificadas através de cultivo em ágar MacConkey. Culturas de fezes em caldo também foram utilizadas e foram artificialmente contaminadas com concentrações conhecidas de STEC. Aliquotas de 500 $\mu$ L das suspensões ou de fezes artificialmente contaminadas com concentrações aproximadas de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  e  $10^0$  UFC/mL de STEC, foram submetidas ao procedimento de extração de DNA pelo método de OLSVIK e STROCKBINE (1993) e posteriormente à PCR de triagem.

### 3.8 Determinação da sensibilidade e especificidade do protocolo

Foram utilizadas as estirpes de STEC descritas na Tabela 2 e *E. coli* ATCC 25922, EPEC (estirpe do laboratório), *Aeromonas*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *E. hermannii*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, cultivados nas como descrito em 3.4, exceto para os cocos gram positivos que foram cultivados em ágar sangue.

#### 3.8.1 Comparação entre PCR e o ensaio de citotoxicidade para STEC

Quarenta e três estirpes de *E. coli* isoladas de bovinos foram analisadas através do protocolo de PCR utilizado neste trabalho para avaliar a sua eficiência frente ao método padrão para a detecção de STEC. Essas estirpes foram previamente testadas no IAL quanto à produção de toxina Shiga em cultura de células Vero.

### 3.9 Pesquisa de colônias de STEC

Nas amostras em que ocorreu amplificação, aproximadamente 200 colônias isoladas, independentemente da reação de lactose, foram transferidas para uma placa de ágar MacConkey com regiões numeradas de 1 a 100, incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 18-24 horas e submetidas à extração de DNA como descrito no item 3.5.2. Novas reações de PCR foram realizadas para identificar as colônias portadoras dos genes responsáveis pela amplificação. Essas colônias foram estocadas em TSB/glicerol 50% a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.10 Identificação bioquímica das STEC

As colônias de STEC isoladas foram identificadas bioquimicamente utilizando o sistema API 20E (BioMérieux).

### 3.11 Seqüenciamento de DNA

Antes de proceder à reação de seqüenciamento, os produtos de PCR foram tratados para eliminar os iniciadores e dNTP. O produto da PCR foi transferido para um novo tubo e foram adicionados  $\frac{1}{10}$  do volume de acetato de amônio 7,5M e dois volumes de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 14000rpm por 15min. O precipitado foi lavado uma vez com etanol 70%, seco e suspenso em 15 $\mu\text{L}$  de água ultra-pura estéril. Dois microlitros foram utilizados para eletroforese e o restante permaneceu congelado a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso. A reação de seqüenciamento foi baseada no método de SANGER (SANGER; NICKLED; COULSON, 1977) utilizando dideoxinucleotídeos fluorescentes. A reação foi realizada em um volume final de 10 $\mu\text{L}$  contendo 10pmol do oligonucleotídeo iniciador específico, 3 $\mu\text{L}$  do produto de PCR purificado e 4 $\mu\text{L}$  do reagente para seqüenciamento DYEnamic ET Sequence Premix Terminator (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences). Foi utilizado o seguinte programa para a reação de seqüenciamento: 30 ciclos de  $94^\circ\text{C}$  por 30s,  $47^\circ\text{C}$  por 30s,  $60^\circ\text{C}$  por 30s. O produto da reação de seqüenciamento foi tratado com 2 $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5M e 55 $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, homogeneizado por inversão e

centrifugado por 15min a 14000rpm. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com etanol 70%, seco e submetido à eletroforese no Sequenciador Automático de DNA modelo ABI Prism 377 DNA Sequencer da Applied Biosystems do Departamento de Bioquímica da UFPR. As seqüências obtidas foram analisadas com os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), BLASTN (ALTSHUL et al., 1997) e CLUSTAL X (JEANMOUGIN, 1998).

### **3.12 Teste de susceptibilidade aos antibióticos**

A susceptibilidade das bactérias isoladas, que apresentaram a banda de amplificação com os iniciadores *stx*, frente aos antibióticos foi determinada pelo método de difusão em ágar (Kirby-Bauer) de acordo com as normas do NCCLS (NCCLS, 2003).

### **3.13 Tipagem sorológica**

As estirpes de STEC foram analisadas quanto à presença do antígeno O157 no LACEN.

### **3.14 Imunoensaio para detecção de toxina Shiga**

As colônias positivas por PCR para genes *stx* foram analisadas, no LACEN, quanto à produção de toxina utilizando o kit comercial VTEC-Screen Seiken (Denka Seiken Co.).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Protocolo para triagem de STEC através da amplificação dos genes *stx*

#### 4.1.1 Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores

O grande número de protocolos de PCR disponíveis na literatura e a descrição de novas variantes de toxina Shiga nos últimos anos, instigaram a procura de um único par de iniciadores capaz de promover a amplificação do maior número possível dos genes *stx*. A determinação da sequência dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizada conforme descrito no item 3.6.1. As seqüências escolhidas foram 5'-ATACAGAG(A/G)G(A/G)ATTTTCGT-3' e 5'-C(C/A)TGATGATG(G/A)CAATTCAG-3'. A primeira foi anteriormente descrita por PATON e colaboradores (1993b), e a última foi modificada no presente trabalho para permitir o reconhecimento de mais um alelo de *stx*<sub>2</sub>. Os nucleotídeos entre parênteses representam bases alternativas adicionadas nas posições indicadas devido à variabilidade existente entre os genes *stx*. Estes iniciadores possibilitam a amplificação da região compreendida entre os nucleotídeos 586 a 802 da subunidade A do gene *stx*<sub>1</sub> produzindo um fragmento de 216pb, e da região compreendida entre os nucleotídeos 586 a 799 da subunidade A do gene *stx*<sub>2</sub> produzindo um fragmento de DNA de 213pb. Esses iniciadores não permitem a amplificação das variantes *stx*<sub>1c</sub> e *stx*<sub>1d</sub>, descritas recentemente, e *stx*<sub>2f</sub> que ainda não foi descrita em estirpes de STEC associadas com infecções em humanos.

#### 4.1.2 Amplificação dos genes *stx*

As condições estabelecidas para a realização da PCR para amplificar os genes *stx* estão descritas na Tabela 4.

O seguinte programa foi utilizado: 1 ciclo de 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 47°C por 30 s, 72°C por 30 s; seguidos de 1 ciclo de 72°C por 10 min.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DOS REATIVOS EMPREGADOS NA PCR PARA OS GENES *stx*

Componente/concentração	Volume
DNA	10,0µL
Tampão de PCR 10X	5,0µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	2,0µL
dNTP 5mM	2,0µL
Iniciador <i>stxF</i> 100pmol	0,5µL
Iniciador <i>stxR</i> 100pmol	0,5µL
<i>Taq</i> DNA Polimerase 5U/µL	0,5µL
Água ultra pura estéril	29,5µL

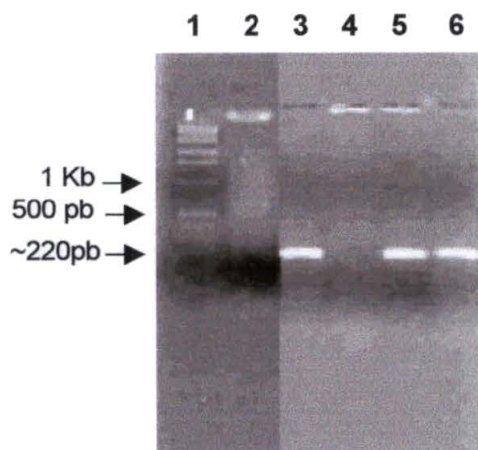
#### 4.1.3 Extração de DNA

Os três métodos de extração de DNA descritos no item 3.5 foram analisados quanto ao desempenho na PCR utilizando amostras de DNA extraído de culturas puras de *E. coli* O157:H7 (*stx*<sub>1</sub><sup>+</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>) e *E. coli* ATCC 25922 (*stx*<sub>1</sub><sup>-</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>-</sup>), ou de fezes artificialmente contaminadas com *E. coli* O157:H7. Quando as amostras de DNA extraídas utilizando os métodos propostos (OLSVIK; STROCKBINE, 1993; PATON; PATON, 1993b; AUSUBEL et al., 1999) foram ensaiadas por PCR para os genes *stx* foram obtidos os resultados que são exibidos na Figura 4.

Os resultados apresentados na Figura 4 linhas 3, 5 e 6 indicam que os três métodos de extração forneceram DNA adequado para a reação de PCR uma vez que todas permitiram a amplificação de bandas do tamanho esperado, aproximadamente 220pb, e aparentemente com a mesma intensidade. Entretanto, em algumas das amostras fecais artificialmente contaminadas com a STEC O157:H7 não ocorreu amplificação com o DNA extraído utilizando o método de PATON (1993b).



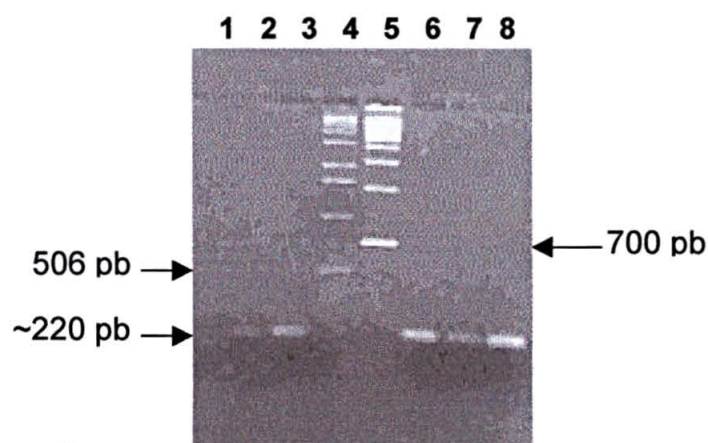
FIGURA 4 – AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *stx* COM DNA DE STEC EXTRAÍDO ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS



Eletoforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR para *stx* 1. marcador de massa molecular 1Kb DNA Ladder; 2. amostra de fezes artificialmente contaminada com STEC O157 ( $stx_1^+ stx_2^+$ ) submetida à extração segundo Paton (sem banda de amplificação); 3. amostra de fezes artificialmente contaminada com STEC O157 ( $stx_1^+ stx_2^+$ ) submetida à extração segundo Olsvik e Strockbine; 4. controle negativo (DNA de *E. coli* ATCC 25922;  $stx_1^- stx_2^-$ ); 5. amostra de fezes artificialmente contaminada com STEC O157 ( $stx_1^+ stx_2^+$ ) submetida à extração segundo Paton; 6. amostra de fezes artificialmente contaminada com STEC O157 ( $stx_1^+ stx_2^+$ ) submetida à extração segundo Ausubel.

O método escolhido para dar seqüência ao trabalho foi o de OLSVIK e STROCKBINE (1993) pela rapidez, menor custo, não toxicidade, facilidade de execução e por ter amplificado todas as amostras. Em resumo o protocolo proposto neste trabalho para a triagem de STEC em amostras fecais emprega cultura em ágar MacConkey seguido da extração de DNA pelo método de OLSVIK e STROCKBINE aliados a PCR para genes *stx* utilizando um único par de iniciadores, o que reduz o custo e mão de obra do ensaio.

Nessas condições foi possível amplificar, de modo reprodutível, os genes *stx* das estirpes de STEC O157:H7 ( $stx_1^+ stx_2^+$ ); O157:H7 ( $stx_1^- stx_2^+$ ); estirpes do IAL e LACEN ) e O111:H8 ( $stx_1^+ stx_2^-$ ) conforme evidenciado na Figura 5.

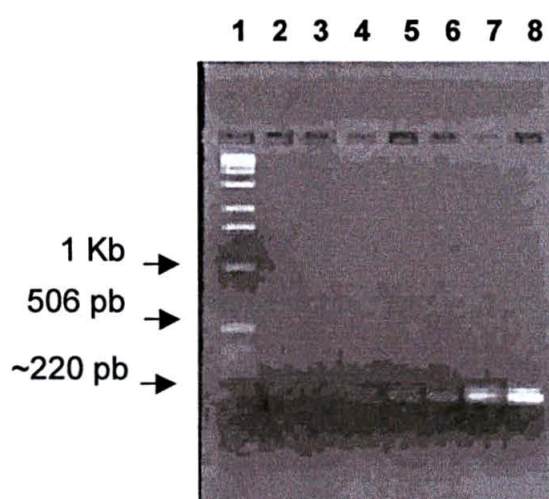
FIGURA 5 – AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *stx*

Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR para *stx*. 1. controle negativo, ausência de banda de amplificação (DNA de *E. coli* ATCC 25922); 2. banda de fraca intensidade de ~220pb (DNA de STEC O157:H7 extraído de suspensão com  $10^2$  UFC/mL); 3. banda de ~220pb (DNA de STEC O157:H7 *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>); 4. marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder; 5. DNA do plasmídeo pCB10 digerido com *Hind* III; 6. banda de ~220pb (DNA de STEC O111:H8 *stx*<sub>1</sub><sup>+</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>-</sup>); 7. banda de ~220pb (DNA de STEC O157:H7 *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>); 8. banda de ~220pb (DNA de STEC O157:H7 *stx*<sub>1</sub><sup>+</sup> *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>).

#### 4.2 Limite de detecção do protocolo

Com o objetivo de conhecer o limite de detecção do método foram preparadas suspensões de STEC O157:H7 (*stx*<sub>1</sub><sup>+</sup>, *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>) com concentrações conhecidas, como descrito no item 3.7. Os resultados obtidos na PCR realizada com concentrações de STEC variando de  $10^5$  a 1 UFC/mL estão mostrados na Figura 6.

FIGURA 6 – LIMITE DE DETECÇÃO DO PROTOCOLO DE TRIAGEM PARA STEC



Eletroforese em gel de agarose a 2% de produtos de PCR para *stx*. 1. 1 Kb DNA Ladder; 2. controle negativo; 3. O157:H7 - 1 UFC/mL; 4. O157:H7 - 10 UFC/mL; 5. O157:H7 -  $10^2$  UFC/mL; 6. O157:H7 -  $10^3$  UFC/mL; 7. O157:H7 -  $10^4$  UFC/mL; 8. STEC O157:H7 -  $10^5$  UFC/mL.

Como observado na Figura 6 o limite de detecção do método é de 100UFC/mL, concentração na qual se observou uma banda intensa no gel corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. Entretanto, a imagem capturada foi prejudicada pelas características do sistema 1D Kodak (DC40 câmera).

### 4.3 Sensibilidade e especificidade do protocolo

Para avaliar a sensibilidade e a especificidade do protocolo proposto para a amplificação dos genes *stx* foram utilizadas estirpes de STEC (Tabela 1) e os organismos não-produtores de toxina Shiga citados no item 3.8.

Diferente do observado com todas as estirpes de STEC analisadas, não houve amplificação da banda de aproximadamente 220pb com o DNA extraído dos organismos não produtores de toxina Shiga.

#### 4.3.1 Comparação entre PCR e o ensaio de citotoxicidade

Das 43 amostras de *E. coli* de origem bovina previamente analisadas através do ensaio de citotoxicidade para células Vero, considerado como método padrão para a detecção de toxina Shiga, 25 foram consideradas como positivas e 18 como negativas em relação à produção da toxina. Quando analisadas através do protocolo proposto nesse trabalho apresentaram os resultados indicados na Tabela 5, onde o teste de citotoxicidade foi considerado como o método padrão. Ensaio com os mesmos resultados em ambos os testes foram considerados como verdadeiros positivos (VP) ou verdadeiros negativos (VN). Os resultados discrepantes pela PCR foram considerados como falsos negativos (FN) ou falsos positivos (FP) (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002).

TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E PCR

PCR	Ensaio de citotoxicidade	
	Positivos	Negativos
Positivos	23 (VP)	04 (FP)
Negativos	02 (FN)	14(VN)

A sensibilidade e especificidade do protocolo de PCR foram calculadas, segundo FORBES, SAHM e WEISSFELD (2002):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \quad \text{e} \quad \text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP}$$



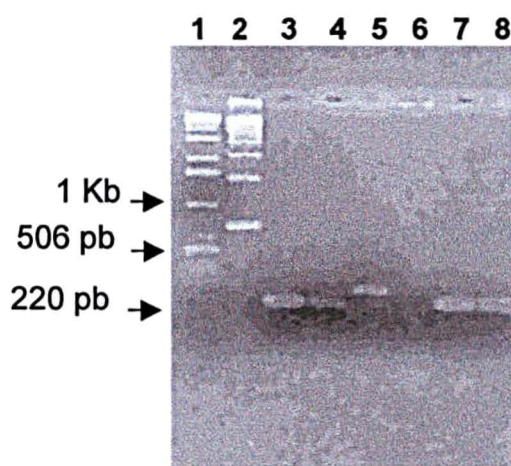
Os valores obtidos foram 92% e 78%, respectivamente, para sensibilidade e especificidade.

#### 4.4 Triagem das amostras de fezes para presença de STEC

Entre as 331 amostras analisadas, 323 foram consideradas como negativas para *stx*, devido à ausência de banda de amplificação de aproximadamente 220pb. Entre estas estão incluídas as 25 amostras dos controles que não apresentavam diarreia.

Em seis amostras, M03, D104, J210, C213, P215 e J307, foram observados produtos de amplificação do tamanho esperado de aproximadamente 220pb, sugerindo a presença de genes *stx* (Figura 7). As amostras foram ensaiadas em condições mais estritas de anelamento (52°C), e não houve alteração no padrão observado. Em duas amostras, designadas T83 e D300, ocorreu a amplificação de fragmentos de DNA de tamanho aproximado de 300pb, maior que o esperado para os genes *stx*. A amplificação desse fragmento persistiu mesmo quando a amostra foi ensaiada em temperatura de anelamento de 52°C. Estas amostras foram submetidas ao mesmo tratamento daquelas que apresentaram a banda de amplificação de aproximadamente 220pb.

FIGURA 7 – PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS EMPREGANDO OS INICIADORES PARA OS GENES *stx*



Eletróforese em gel agarose a 2% de amostras que apresentaram bandas de amplificação com os iniciadores para *stx*. 1. 1 Kb DNA Ladder; 2. pCB10 digerido com *Hind* III; 3. amostra M03; 4. amostra D104; 5. amostra T83; 6. controle negativo; 7. STEC O111:H8 (*stx*<sub>1</sub><sup>+</sup>, *stx*<sub>2</sub><sup>-</sup>); 8. STEC O157:H7 (*stx*<sub>1</sub><sup>+</sup>, *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>).

As amostras que apresentaram bandas de amplificação foram coletadas durante os meses de março (T83 e D104), junho (J210, C213 e P215), outubro (D300 e J307) e novembro (M03) como evidenciado na Figura 8.

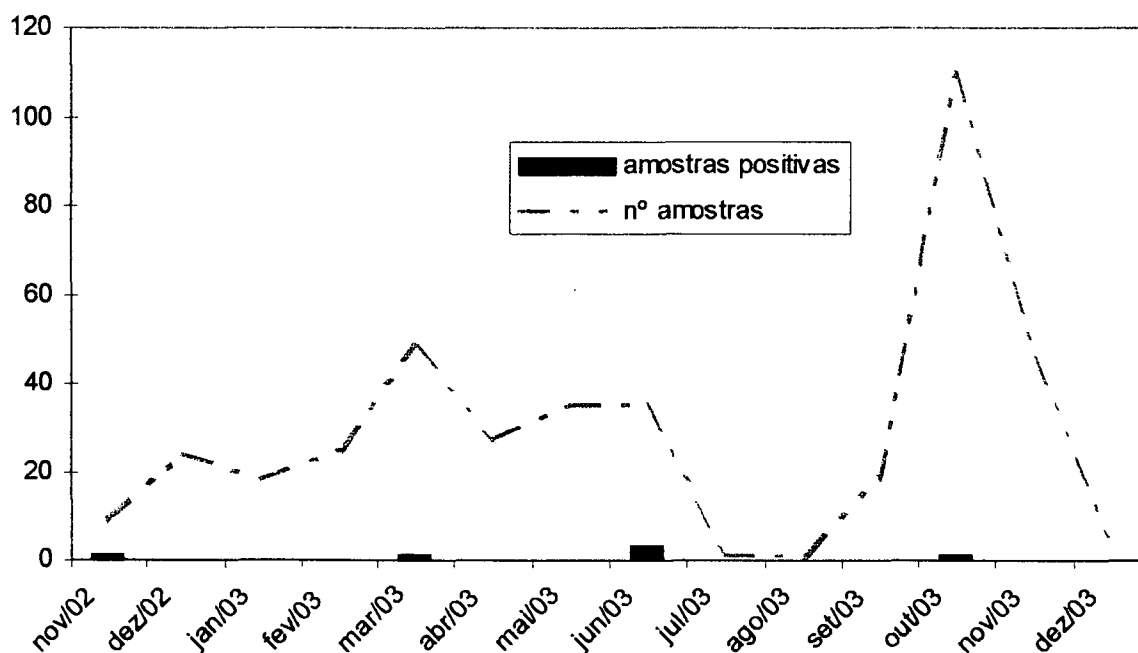
A Tabela 6 mostra informações sobre a procedência e o sexo das crianças cujas amostras foram amplificadas com os iniciadores para *stx*.

TABELA 6 – DADOS REFERENTES ÀS AMOSTRAS QUE APRESENTARAM BANDA DE AMPLIFICAÇÃO NA PCR

Identificação	Sexo	Amplicon (pb)	Procedência
M03	F	~220	Telêmaco Borba
T83	M	~300	São J. dos Pinhais
D104	M	~220	Colombo
J210	M	~220	Colombo
C213	M	~220	Colombo
P215	M	~220	Colombo
D300	F	~300	Araucária
J307	F	~220	Araucária

LEGENDA: F – sexo feminino; M – sexo masculino.

FIGURA 8 – POSITIVIDADE DAS AMOSTRAS POR PCR DURANTE O ANO



Colônias isoladas dessas amostras foram submetidas novamente ao protocolo para detecção de *stx* conforme o item 4.1. Em apenas cinco das oito amostras foi possível isolar as colônias associadas com a produção da banda de amplificação. Em duas amostras, D104 e J307, foi observada grande instabilidade dos genes *stx*.

Considerando as seis estirpes de STEC isoladas na população de 306 amostras de fezes diarréicas obteve-se uma incidência de 1,96% nessa população.

#### **4.5 Identificação bioquímica e perfil de susceptibilidade das bactérias**

Os resultados obtidos na identificação bioquímica e antibiograma das bactérias estão descritos nas Tabelas 7 e 8.

#### **4.6 Teste das bactérias frente ao antisoro O157**

Todas as estirpes de STEC isoladas foram não-reagentes frente ao antisoro O157, sendo caracterizadas como não-O157.

#### **4.7 Imunoensaio para detecção de toxina Shiga**

As cinco estirpes isoladas foram testadas quanto à produção de toxina Shiga (conforme item 3.12) sendo o resultado positivo apenas para a estirpe de STEC isolada da amostra M03, com título de 1:16.

TABELA 7 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS  
ISOLADAS NA TRIAGEM PARA *stx*

Prova	Amostra				
	M03	T83	D104	D300	J307
ONPG	+	+	+	-	+
ADH	-	+	+	+	+
LDC	+	-	+	-	+
ODC	+	-	+	-	-
CIT	-	+	-	+	-
H <sub>2</sub> S	-	+	-	-	-
URE	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-
IND	+	-	+	-	+
VP	-	-	-	+	-
GEL	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	+	-
SOR	+	+	+	-	+
RHA	-	+	+	-	+
SAC	+	-	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+
AMI	-	-	-	+	-
ARA	+	+	+	+	+
<b>Identificação</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>C. freundii</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>E. cloacae</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>

LEGENDA: ONPG – o-nitrofenol-galactopiranosídeo; ADH – desaminação da L-arginina; LDC – lisina; ODC – ornitina; CIT – citrato; H<sub>2</sub>S – produção de ácido sulfídrico; URE – uréia; TDA – desaminação do L-triptofano ; IND – indol; VP – prova de Voges Proskauer; GEL – gelatina; GLU – glicose; MAN – manose; INO – inositol SOR – sorbitol; RHA – ramnose; SAC – sacarose; MEL – melibiose; AMI – amigdalina; ARA – arabinose.

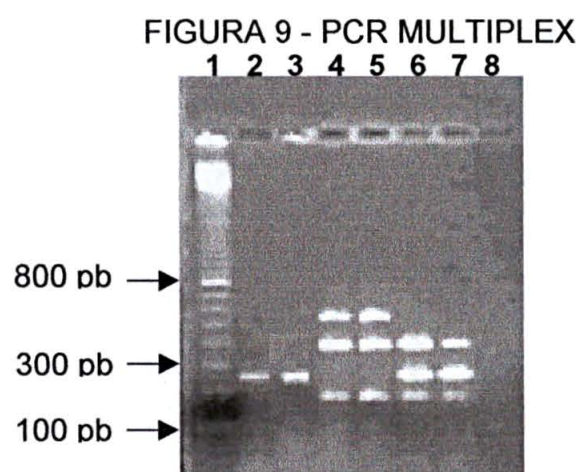
TABELA 8 – PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DAS BACTÉRIAS ISOLADAS

Antibiótico	Susceptibilidade				
	M03	T83	D104	D300	J307
Ácido nalidíxico	S	S	S	S	S
Amicacina	S	S	S	S	S
Ampicilina	R	R	R	R	I
Cefalotina	S	I	S	I	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S
Nitrofurantoína	S	S	S	S	S
Norfloxacina	S	S	S	S	S
Sulfametoxazol+ Trimetoprim	S	S	S	S	S

LEGENDA: R – resistente; I – intermediário; S – sensível

#### 4.8 PCR multiplex para os genes de virulência *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA* e *hlyA*

As bactérias isoladas foram analisadas através de PCR Multiplex para a presença dos genes de virulência *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA* e *hlyA* como descrito no item 3.6.2. Os resultados estão indicados na Figura 9 e Tabela 9.



Eletróforese em gel agarose a 2% de amostras de *E. coli* isoladas. 1. 100 pb DNA Ladder; 2. amostra J307 (*stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>, *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup>); 3. amostra D104 (*stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>, *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup>); 4. amostra M03 (*stx*<sub>1</sub><sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup>, *hly*<sup>+</sup>); 5. amostra de STEC O111:H8 (*stx*<sub>1</sub><sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup>, *hly*<sup>+</sup>); 6 e 7. STEC O157:H7 (*stx*<sub>1</sub><sup>+</sup>, *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup>); 8. controle negativo.



TABELA 9 – GENÓTIPO DAS ESTIRPES DE *E. coli* ISOLADAS

Amostra	Genótipo	Sorogrupo
M03	<i>stx</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> <i>eae</i> <sup>+</sup> <i>hly</i> <sup>+</sup>	não-O157
D104	<i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup>	não-O157
J307	<i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup>	não-O157

#### 4.9 Seqüenciamento dos amplicons

Os resultados obtidos no seqüenciamento dos amplicons, após a comparação com os dados depositados no GenBank e alinhamento através do programa Clustal X estão mostrados na Tabela 10 e nas Figuras de 10 a 18.

TABELA 10 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS AMPLICONS COM AS SEQUÊNCIAS DE GENES DEPOSITADAS NO GENBANK

Amplicon	Homologia	Valor de e	Identidade (%)
M03	<i>stx</i> <sub>1</sub>	1e -90	100
D104	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	1e -110	100
J210	<i>stx</i> <sub>2</sub>	1e -19	92
C213	<i>stx</i> <sub>1</sub>	2e -26	93
P215	<i>stx</i> <sub>1</sub>	9e -22	94
T83	gene STY1063 (putative bacteriophage protein)	5e -87	92
D300	gene STY1063 (putative bacteriophage protein)	3e -73	89
J307	<i>stx</i> <sub>2</sub>	9e -88	98

**FIGURA 10 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON M03 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE *stx*<sub>1</sub>**

```

stx1  ATACAGAGGGGATTTTCGTACAACACTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAATGACT
M03   ATACAGAGGGGATTTTCGTACAACACTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAATGACT
      *****

stx1  GCTGAAGATGTTGATCTTACATTGAACTGGGGAAGGTTGAGTAGCGTCCTGCCTGACTAT
M03   GCTGAAGATGTTGATCTTACATTGAACTGGGGAAGGTTGAGTAGCGTCCTGCCTGACTAT
      *****

stx1  CATGGACAAGACTCTGTTTCGTGTAGGAAGAATTTCTTTTGAAGCATTAAT
M03   CATGGACAAGACTCTGTTTCGTGTAGGAAGAATTTCTTTTGAAGCATTAAT
      *****

```

**NOTA:** As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X.  
Os nucleotídeos idênticos nos dois fragmentos estão indicados por asteriscos.

**FIGURA 11 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON T83 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE *STY* 1063 DE *S. typhi***

```

STY1063 CAATTCAGGAAATTCGCTGAC-AGCGGACAACCAGCAGTTCAGCATCGTCCTGGGTGGT
T83     CAATTCAGGAAATCCCGCTGACCAGCGGATAACCAACAATTCAGCATCATCCAGGCTGGT
      *****

STY1063 GTCACCTGGCGGATTAGCATCATATGGCGCGATCTGTACTGGATTATGGACCTGCAGAAC
T83     ACCACCTGGCGGATTAGCATCACCTGGCGCGATCTGTACTGGATTATGGACCTGCAGAAC
      *****

STY1063 GACAGAGGGGAGCCGGTAATCTCCGGTATTCCTCTCGTCACTGGTGCTGACCTGCTGGCG
T83     GACAGAGGGGAGCCGGTAATCTCCGGTATTCCTCTCGTCACTGGTGCTGACCTGCTGGCG
      *****

STY1063 CAGTACGCCTGTATGGGGCTTGTTTAAAGCTGGTGGTGGTCTGTGATGACAACACACAG
T83     CAGTACGCCTATATGGGGCTTGTTTAAAGCTGGTGGTGGTCTGCGATGACAGCACACAG
      *****

STY1063 GATTACCCAC
T83     GATTATCCGAC
      *****

```

**NOTA:** As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X.  
Os nucleotídeos idênticos nos dois fragmentos estão indicados por asteriscos.  
Os nucleotídeos sublinhados indicam a região de anelamento do iniciador *stxR*.

FIGURA 12 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON D104 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DOS GENES *stx*<sub>2</sub>

```

stx2g  ATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGA
stx2d  ATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGA
stx2c  ATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGA
stx2   ATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGA
stx2e  ATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGA
D104   ATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGA
*****

stx2g  CCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGG
stx2d  CCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGG
stx2c  CCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGG
stx2   CCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGG
stx2e  CCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGG
D104   CCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGG
*****

stx2g  TGTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGGCCGT
stx2d  TGTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGGCCGT
stx2c  TGTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGGCCGT
stx2   TGTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGGCCGT
stx2e  TGTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGGCCGT
D104   TGTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGGCCGT
*****

stx2g  TATACTGAATTGCCATCATCAGG
stx2d  TATACTGAATTGCCATCATCAGG
stx2c  TATACTGAATTGCCATCATCAGG
stx2   TATACTGAATTGCCATCATCAGG
stx2e  TATACTGAATTGCCATCATCAGG
D104   TATACTGAATTGCCATCATCAGG
*****

```

NOTA: As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X.

Os nucleotídeos idênticos nos dois fragmentos estão indicados por asteriscos.

Os retângulos indicam a homologia entre a sequência D104 e o gene *stx*<sub>2e</sub>.

**FIGURA 13 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON J210 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DOS GENES *stx*<sub>2</sub>**

```

stx2c  TGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATG
stx2    TGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATG
stx2d  TGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATG
stxg    TGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATG
stx2e  TTTATACGATGACGCCGGAAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGAGAATCAGCAATG
J210    TGTATACGATGACTCCGGGAGACGTTGACCTCACTCTGAACTGGGGAAGAATCAGCAATG
* ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
stx2c  TGCTTCCGGAGTATC
stx2    TGCTTCCGGAGTATC
stx2d  TGCTTCCGGAGTATC
stxg    TGCTTCCGGAGTATC
stx2e  TGCTTCCGGAGTATC
J210    TCCTTCCGGAATATC
* ***** *****

```

**NOTA:** As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X.  
Os nucleotídeos idênticos nos dois fragmentos estão indicados por asteriscos.

**FIGURA 14 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON C213 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DOS GENES *stx*<sub>1</sub>**

```

stx1  GGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAATGACTGCTGAAGATG-TTGATCTTACATTGA
C213  GGATGATNTCAGTGGGCNTTCT-AAACGATGACTCCGGGAGATGGTTGACCTCACATTGA
***** ***** ***** * ***** * * ***** ***** ** *****

stx1  ACTGGGGAAGGTTGAGTAGCGTCCTGCCTGACTATCATGGACAAGACTCTGTTCGTGTAG
C213  ACTGGGGAAGATTGAGCAATGTCCTTCCTGATTATCATGGACAAGACTCTGTTCGTGTAG
***** ***** * ***** ***** ***** ***** ***** *****

stx1  GAAGAATTTCTTTT
C213  GAAGAATATCCTTT
***** ** ***

```

**NOTA:** As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X.  
Os nucleotídeos idênticos nos dois fragmentos estão indicados por asteriscos.

**FIGURA 15 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON P215 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DOS GENES *stx*<sub>1</sub>**

```

stx1  AATGACTGCTG-AAGATGTTGATCTTACATTGAACTGGGGAAGGTTGAGTAGCGTCCTGC
P215  AATGACATCCGGNAGANGTNGACCTCACTTTGAACTGGGGAAGATTGAGCAATGTCCTGC
      *****  * *  *** ** ** ** ** ***** *  *****

stx1  CTGACTATCATGGACAAGACTCTGTTCGTGTAGGAAGAATTTCTTTTG
P215  CTGATTATCATGGACAAGACTCTGTCCGTGTAGGAAGAATATCCTTTG
      ****  ***** ***** ***** **  ****

```

**NOTA:** As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X.  
Os nucleotídeos idênticos nos dois fragmentos estão indicados por asteriscos.

**FIGURA 16 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON D300 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DO GENE STY 1063 DE *S. typhi***

```

STY1063  CAATTCAGGAAATTCCGCTGACAGC----GGACAACCAGCAGTTCAGCATCGTCCTGGGT
D300     CAATTCAGGAAATCCCGCTGTCAGCTTGCGGATAACCAGCAATTCAGCATCATCCTGGCG
      ***** ***** *****  *** ***** ***** *****

STY1063  GGTGTCACCTGGCGGATTAGCATCATATGGCGCGATCTGTACTGGATTATGGACCTGCAG
D300     GGGACCACCTGGCGGATTAGCATCACCTGGCGCGATCTGTACTGGATTATGGACCTGCAG
      **  ***** ***** ***** *****

STY1063  AACGACAGAGGGGAGCCGTAATCTCCGGTATTCCTCTCGTCACTGGTGCTGACCTGCTG
D300     AACGACAGAGGGGAGCCGTAATCTCCGGTATTCCTCTCGTCAACGGCGCTGACCTGCTG
      ***** ***** ***** ** *****

STY1063  GCGCAGTACGCCTGTATGGGGCTTGTTTAAAGCTGGTGGTGGTCTGTGATGACAACACA
D300     GCGCAGTATGGCTATATGGGACTCGGCTTTAAGCTGGTGGTGGTCTGCGACGACAGACA
      ***** * ** ***** ** ** ***** ***** *****

STY1063  CAGGATTACCCACAAA
D300     CAGGATTACCCGACGAA
      ***** ** **

```

**NOTA:** As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X.  
Os nucleotídeos idênticos nos dois fragmentos estão indicados por asteriscos.  
Os traços (-) representam a ausência de nucleotídeos.  
Os nucleotídeos sublinhados indicam a região de anelamento do iniciador *stxR*.

**FIGURA 17 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO AMPLICON J307 COM A REGIÃO CORRESPONDENTE DOS GENES *stx*<sub>2</sub>**

```

stx2c  ATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCG
stx2   ATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCG
stx2d  ATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCG
stx2g  ATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCG
stx294C ATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACCATGACGCCG
J307   ATACAGAGGGGATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACCATGACGCCG
      ***** * *****

stx2c  GGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGG
stx2   GGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGG
stx2d  GGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGG
stx2g  GGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGG
stx294C GGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGG
J307   GGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGG
      *****

stx2c  GGAGAGGATGGTGTGTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATA
stx2   GGAGAGGATGGTGTGTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATA
stx2d  GGAGAGGATGGTGTGTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATA
stx2g  GGAGAGGATGGTGTGTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATA
stx294C GGAGAGGATGGTGTGTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATA
J307   GGAGAGGATGGTGTGTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATA
      *****

```

**NOTA:** As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X.  
Os nucleotídeos idênticos nos dois fragmentos estão indicados por asteriscos.

**FIGURA 18 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS AMPLICONS T83 E D300**

```

D300   CCTGATGATGGCAATTCAGGAAATCCCGCTGTCAGCTTGCGGATAACCAGCAATTCAG
T83    CCTGATGATGGCAATTCAGGAAATCCCGCTG---ACCAGCGGATAACCAACAATTCAG
      ***** * *****

D300   CATCATCCTGGCGGGGACCACCTGGCGGATTAGCATCACCTGGCGCGATCTGTACTGGAT
T83    CATCATCCAGGCTGGTACCACCTGGCGGATTAGCATCACCTGGCGCGATCTGTACTGGAT
      ***** ** * *****

D300   TATGGACCTGCAGAACGACAGAGGGGAGCCGGTAATCTCCGGTATTCTCTCGTCACCGG
T83    TATGGACCTGCAGAACGACAGAGGGGAGCCGGTAATCTCCGGTATTCTCTCGTCACGGG
      ***** **

D300   CGCTGACCTGCTGGCGCAGTATGGCTATATGGGACTCGGCTTTAAGCTGGTGGTGGTCTG
T83    GGTGACCTGTTGGCGCAGTACGCCTATATGGGGCTTGGTTTTAAGCTGGTGGTGGTCTG
      * ***** * ***** ** * *****

D300   CGACGACAGCACACAGGATTACCCGAC
T83    CGATGACAGCACACAGGATTATCCGAC
      *** *****

```

**NOTA:** As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X.  
Os nucleotídeos idênticos nos dois fragmentos estão indicados por asteriscos.  
Os traços (-) representam a ausência de nucleotídeos.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo a reação de PCR foi escolhida para a triagem de STEC em amostras fecais devido a sua versatilidade e elevadas sensibilidade e especificidade. O gene *stx* foi selecionado como alvo para a detecção das STEC pois além de marcador deste grupo de bactérias, é provavelmente o fator de virulência mais danoso para os humanos (KARMALI et al., 1983b; KARMALI et al., 1985; TARR; NEILL, 1996).

Os três métodos de extração de DNA testados foram igualmente eficazes na reação de PCR, para DNA extraído de culturas puras de *E. coli*. Entretanto, quando a extração de DNA foi realizada a partir de culturas de fezes contaminadas artificialmente com STEC observou-se, em algumas amostras tratadas pela metodologia descrita por PATON e PATON (1993b), um efeito inibidor sobre a ação da *Taq* DNA Polimerase, o que não foi observado para as mesmas amostras processadas através das outras duas técnicas de extração (Figura 4). Mesmo quando gelatina 0,1%, Tween 20 0,1% e Nonidet P-40 0,1% (PATON; PATON, 1993b) foram adicionados à mistura reacional, não foi observada amplificação para aquelas amostras. Além disso, esta metodologia apresenta um custo mais elevado devido ao uso de proteinase K e lisozima. A vantagem da metodologia de PATON é a redução no tempo de execução do ensaio. O método descrito por AUSUBEL e colaboradores (1999) apresentou bons resultados, mesmo nas culturas de fezes artificialmente contaminadas com STEC, mas apresenta desvantagens como o uso de reativos tóxicos, caros (proteinase K) e várias etapas de manipulação da amostra. Por essas razões o método selecionado para dar continuidade ao trabalho, foi o método da fervura descrito por OLSVIK e STROCKBINE (1993).

A opção por um único par de iniciadores, e a adoção de um método rápido e barato de extração de DNA reduz o custo do teste e o volume de trabalho, facilitando a análise e otimizando o processamento simultâneo de várias amostras.

O limite de detecção obtido, 100 UFC/mL (Figura 6), indica que o ensaio é sensível. PATON e PATON (1993b) relatam um limite de detecção de 1 UFC/mL mas utilizam para a detecção dos produtos de PCR, hibridização com uma sonda para genes *stx* o que aumenta a sensibilidade do teste.

Com relação à especificidade, foi analisado DNA extraído das estirpes de STEC e estirpes de *E. coli* e outras bactérias *stx*<sup>-</sup>. Nas últimas não houve amplificação das bandas de aproximadamente 220pb, ao passo que estas estavam presentes em todas as estirpes de STEC analisadas, como era esperado.

Quando comparado ao método padrão para a detecção de toxinas Shiga, o ensaio de citotoxicidade em células Vero (Tabela 5); o protocolo utilizado apresentou sensibilidade de 92% e especificidade de 78%. Quatro amostras apresentaram resultado falso positivo (negativas no teste de citotoxicidade e positivas pelo protocolo de triagem), fato que poderia ser justificado devido à existência de estirpes que possuem o gene *stx* mas não o expressam, ou expressam em concentrações muito baixas para serem detectadas, o que indicaria que a PCR, detectando diretamente a presença dos genes *stx*, teria maior poder para discriminar entre estirpes *stx*<sup>+</sup> e *stx*<sup>-</sup>. Assim, o valor obtido para especificidade pode estar sendo subestimado porque os resultados considerados como falsos-positivos poderiam não estar sendo detectados pelo método de referência.

O resultado falso negativo para duas amostras (positivo no ensaio de citotoxicidade e negativo no protocolo de triagem) pode ser decorrente de alguns fatores: (1) reações inespecíficas podem ter ocorrido no teste de citotoxicidade; (2) pode ter ocorrido perda do gene *stx* durante o subcultivo; ou (3) como as estirpes testadas ainda não foram caracterizadas é possível que contenham um gene variante não detectado pelos iniciadores utilizados.

Quando protocolo estabelecido neste trabalho foi aplicado à triagem de STEC em amostras clínicas, mostrou ser prático e adequado à rotina laboratorial permitindo a análise de amostras em aproximadamente cinco horas, excluindo-se o tempo de cultivo.

Entre as 306 amostras de crianças com diarreia, seis apresentaram a banda de amplificação do tamanho esperado (Figura 7). Isto corresponde a uma incidência de STEC de 1,96% na população estudada. Este valor pode estar sendo subestimado, uma vez que nem todas as amostras analisadas foram mantidas em condições ideais desde o momento da coleta até a análise. Ainda assim, este valor está dentro da faixa de 1,5 a 4,0% descrita para a população norte-americana quando métodos moleculares foram utilizados para diagnóstico (KEHL, 2002), e



igual àquela relatada por KLEIN e colaboradores (2002) de 2,1% em uma população de crianças com diarreia.

Este é o primeiro relato sobre o isolamento e frequência de STEC em fezes de humanos no Paraná. As STEC foram isoladas de crianças procedentes dos municípios de Araucária e Colombo que fazem parte da região metropolitana de Curitiba, e de Telêmaco Borba município localizado a cerca de 250 km da capital paranaense. Três das amostras positivas foram coletadas em meses de clima quente, verão e início do outono, mas as outras três, no mês de junho, geralmente período de baixas temperaturas, sugerindo que as infecções por STEC ocorrem durante o ano todo, (Figura 8) não havendo predomínio nos meses quentes. Entretanto o número de casos estudados é pequeno, e a análise de uma amostra maior é necessária para confirmar o achado.

Das 6 amostras que produziram a banda de amplificação de 220pb (Tabela 6), em apenas 3 foi possível isolar os organismos que continham genes *stx*. Segundo PATON e colaboradores (1996) isto pode ocorrer devido a presença de um grande número de outros coliformes nas amostras e à alta sensibilidade da PCR. Portanto, a detecção sensível dos genes *stx* em uma mistura de bactérias não garante necessariamente o isolamento de STEC, uma vez que ocorre uma rápida queda no número de organismos excretados nas fezes poucos dias após o início dos sintomas (KARCH et al., 1999) requerendo a análise de muitas colônias isoladas, resultando em custo e trabalho aumentados. Este achado reforça a importância da utilização da PCR na triagem de STEC em amostras clínicas.

As 3 estirpes foram isoladas de crianças com diarreia, mas sem evidência de sangue nas fezes. Todas pertencem ao grupo das STEC não-O157 (Tabela 9), o que está de acordo com os achados de IRINO e colaboradores (2002), que mostram a prevalência de STEC não-O157 no país. Todas apresentaram a reação de sorbitol positiva (Tabela 7), o que reforça a baixa sensibilidade do MacConkey Sorbitol para a triagem de STEC e a importância do emprego de métodos capazes de detectar também as STEC não-O157.

As estirpes de *E. coli* isoladas foram positivas para a reação de descarboxilação da lisina (Tabela 7). GUTH e colaboradores (2003a) observaram que estirpes de STEC do sorogrupo O111 não são capazes de descarboxilar esse aminoácido, característica que permite diferenciá-las de outras categorias de *E. coli*

patogênicas do mesmo sorogrupo e que poderia ser utilizada na identificação presuntiva de STEC O111. Assim, embora as estirpes de STEC isoladas no presente trabalho não tenham sido tipadas sorologicamente, a propriedade de descarboxilar a lisina seria uma prova presuntiva de que as mesmas não pertencem ao sorogrupo O111.

O perfil de susceptibilidade aos antibióticos (Tabela 8) mostra que as estirpes de STEC isoladas são sensíveis a maioria dos antibióticos testados, com exceção da ampicilina. A resistência a este antibiótico entre as STEC já foi reportada por vários autores (EKLUND, SCHEUTZ, SIITONEN, 2001; SCHROEDER et al., 2002; GUTH et al., 2003b). Diferente dos resultados de SCHROEDER e colaboradores (2002), em estudo realizado com estirpes de STEC isoladas em vários países, que detectaram que cerca de 70% das estirpes eram multi-resistentes, e do relato de EKLUND, SCHEUTZ e SIITONEN (2001), realizado basicamente com estirpes isoladas na Finlândia, que encontraram 21% de estirpes resistentes a um ou mais antibióticos, o perfil de susceptibilidade das STEC isoladas de humanos no Brasil indica que esses organismos são na sua maioria sensíveis aos antibióticos (GUTH et al., 2003b), dado que é reforçado pelos resultados do presente trabalho.

Em duas das estirpes de *E. coli* foi observada uma grande instabilidade dos genes *stx* em subcultivos. A perda de genes *stx* em estirpes de STEC durante o isolamento ou subcultivo já foi descrita nos sorotipos O2:H5, O26:H11, O73:H34 e O100:H32 (KARCH et al., 1992), e em estirpes *stx*<sup>+</sup> de *C. freundii* e *E. cloacae* (TSCHÄPE et al., 1995; PATON; PATON, 1997). A perda de genes *stx* foi associada com o desaparecimento de um fragmento *Xba*I de 70 a 80 kb do DNA da STEC O157:H7 analisado em eletroforese em campo pulsado, o que possivelmente está associado com a excisão do fago (MURASE et al., 1999).

Quando analisadas frente aos anticorpos anti-toxinas Shiga 1 e 2 através do imunoensaio de aglutinação passiva reversa VTEC-Screen Seiken, apenas uma das 3 estirpes de *E. coli* isoladas mostrou reação positiva comprovando a produção de toxina. Esta *E. coli* apresenta o gene *stx*<sub>1</sub>, ao passo que as estirpes não reagentes contém genes *stx*<sub>2</sub> ou suas formas variantes. Estes dados confirmam o relato de BEUTIN, ZIMMERMANN e GLEIER (2002), que mencionam a falha do VTEC

Screen- Seiken na detecção de algumas Stx2 e não reagem ou o fazem fracamente com algumas variantes de Stx2.

O ensaio para detecção de genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae* e *hly* através de PCR Multiplex foi realizado para estimar o potencial de virulência das estirpes em estudo. Na estirpe M03, foram detectados os genes *stx*<sub>1</sub>, *eae* e *hly* (Figura 9 e Tabela 9). A presença do gene *stx*<sub>1</sub> foi confirmada através de seqüenciamento de DNA (Figura 10). A presença dos genes *stx*<sub>1</sub>, *eaeA* e *hlyA* foi descrita por GUTH e colaboradores (2002a) em duas estirpes de STEC sorogrupo O111 isoladas de crianças com diarreia e sem presença de sangue nas fezes, como observado nas amostras analisadas neste estudo. Outros trabalhos indicam que a associação entre *stx*<sub>1</sub> e *eae* parece ser muito comum nas estirpes de STEC isoladas no país (IRINO et al., 2000; GUTH et al., 2000; 2003b).

As estirpes D104 e J307 apresentaram um perfil diferente. Houve amplificação apenas da banda referente ao gene *stx*<sub>2</sub>, o que lhes confere o genótipo *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup>, *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>, *eae*<sup>-</sup> e *hly*<sup>-</sup>. Os genes *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2vha</sub>, *stx*<sub>2vhb</sub>, já foram encontrados em várias estirpes de STEC no Brasil, mas aparentemente em associação com *eae* e *hly*. Assim, aparentemente o perfil apresentado pelas estirpes D104 e J307 ainda não foi descrito no país. Contudo, já foi relatado entre estirpes não-O157 na Finlândia e associado com casos esporádicos de infecção por STEC (EKLUND, SCHEUTZ, SIITONEN, 2001). A ausência do gene *eae*, que se localiza na ilha de patogenicidade LEE, levanta a possibilidade que as estirpes D104 e J307 possam conter o gene *saa* (PATON et al., 2001), descrito até o momento somente em estirpes que não contém LEE.

Os amplicons obtidos com os iniciadores *stxF* e *stxR* foram submetidos à reação de seqüenciamento. Os resultados são exibidos na Tabela 10 e nas Figuras de 10 a 18. Para o amplicon da estirpe M03 houve 100% de homologia com o gene *stx*<sub>1</sub> descrito por JACKSON e colaboradores (1987) considerando-se a região que foi seqüenciada (Tabela 10 e Figura 10). Para as amostras denominadas C213 e P215, nas quais não foi possível o isolamento das colônias de STEC, o seqüenciamento de DNA confirmou a presença de genes *stx* e sugere que sejam genes *stx*<sub>1</sub> (Figuras 14 e 15). O mesmo ocorreu com a amostra J210 na qual foi encontrado um gene *stx*<sub>2</sub> (Figura 13).

Para os amplicons D104 e J307 houve homologia com genes *stx*<sub>2</sub>. Para o primeiro houve 100% de identidade com a sequência correspondente da variante *stx*<sub>2e</sub> (Tabela 10 e Figura 12). Esse dado precisa ser confirmado com o seqüenciamento total do gene. A variante *Stx*<sub>2e</sub> foi descrita inicialmente em suínos, mas posteriormente foi isolada de casos de infecção em humanos. Na estirpe de STEC O101 a presença de *stx*<sub>2e</sub> foi descrita concomitantemente com a ausência dos genes de virulência *eae* e *hly* (THOMAS et al., 1994; FRANKE et al., 1995), o que também foi observado para a estirpe D104.

O amplicon J307 apresentou maior nível de homologia com a variante *stx*<sub>2</sub> 94C, descrita por PATON e colaboradores (1995) (Figura 17). Estirpes com as variantes de *stx*<sub>2</sub> acima descritas já foram isoladas de casos de diarreia e SHU.

O seqüenciamento dos amplicons T83 e D300, que apresentam aproximadamente 300pb, indicou homologia com o gene STY1063 (Tabela 10 e Figuras 11, 16 e 18). Este gene foi identificado durante o seqüenciamento do genoma de *Salmonella typhi* (PARKHILL et al., 2001). Codifica uma hipotética proteína de fago com função desconhecida. Considerando a importância dos fagos sobre a virulência bacteriana (WAGNER; WALDOR, 2002), pode-se especular que o achado deste gene no genoma de *E. cloacae* e *C. freundii* possa conferir a essas duas estirpes propriedades de virulência compartilhadas com *S. typhi*.

## 6 CONCLUSÕES

1. Foi estabelecido um protocolo de PCR custo-efetivo para a triagem e isolamento de STEC em amostras fecais com limite de detecção de 100 UFC/mL;
2. Estirpes de STEC foram detectadas em 6 de 306 crianças com diarreia, indicando uma incidência de 1,96% nessa população;
3. As amostras M03, C213 e P215 continham genes *stx*<sub>1</sub> e as amostras D104, J210 e J307 genes *stx*<sub>2</sub> ou seus variantes;
4. As 3 estirpes de STEC isoladas pertencem ao grupo das STEC não-O157 e são sensíveis à maioria dos antibióticos testados, excetuando-se a ampicilina;
5. A estirpe M03 apresentou os genes de virulência: *stx*<sub>1</sub>, *eae* e *hly*;
6. As estirpes D104 e J307 apresentaram apenas os genes *stx*<sub>2</sub>, e não produziram bandas de amplificação com os iniciadores para *eae* e *hly*;
7. Genes com alta homologia com o gene STY1063, que codifica uma hipotética proteína de fago de função desconhecida, descrito em *Salmonella typhi*, foram detectados em estirpes de *C. freundii* e *E. cloacae*.

## REFERÊNCIAS

- ACHESON, D.W.K.; MOORE, R.; DE BREUCKER, S.; LINCICOME, L.; JACEWICZ, M.; SKUTELSKY, E.; KEUSCH, G.T. Translocation of Shiga Toxin across Polarized Intestinal Cells in Tissue Culture. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 8, p. 3294-3300, 1996.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, J.A.B.; MOREIRA, C.; FAGUNDES-NETO, U. Diarréia persistente. **J. Ped.**, v. 76, supl. 2, p. S119-S126, 2000.
- ARMSTRONG, G.D.; ROWE, P.C.; GOODYER, P.; ORRBINE, E.; KLASSEN, T.P.; WELLS, G.; MACKENZIE, A.; LIOR, H.; BLANCHARD, C.; AUCLAIR, F.; THOMPSON, B.; RAFTER, D.J.; MCLAINE, P.N. A Phase I Study of Chemically Synthesized Verotoxin (Shiga-like Toxin) Pk-Trisaccharide Receptors Attached to Chromosorb for Preventing Hemolytic-Uremic Syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 1042-1045, 1995.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.
- BEERS, M.; CAMERON, S. Hemolytic Uremic Syndrome. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 1, p.154-155, 1995.
- BELL, B.P.; GOLDOFT, M.; GRIFFIN, P.M.; DAVIS, M.A.; GORDON, D.C.; TARR, P.I.; BARTLESON, C.A.; LEWIS, J.H.; BARRETT, T.J.; WELLS, J.G.; BARON, R.; KOBAYASHI, J. A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7- Associated Bloody Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From Hamburgers – The Washington Experience. **JAMA**, v. 272, n. 17, p. 1349-1353, 1994.
- BERKELMAN, R.L. Introduction - Demographic and social changes have contributed to the emergence of infectious diseases. In: HORSBURGH Jr., R.C.; NELSON, A.M. **Pathology of Emerging Infections**. Washington, D.C : ASM, 1997. p. 1-19.
- BESSER, R.E.; LETT, S.M.; WEBER, J.T.; DOYLE, M.P.; BARRETT, T.J.; WELLS, J.G.; GRIFFIN, P.M. An Outbreak of Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh-Pressed Apple Cider. **JAMA**, v. 269, n. 17, p.2217-2220, 1993.
- BEUTIN, L.; ALEKSIC, S.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 183, p.13-21, 1994.
- BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Human Infections with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Other Than Serogroup O157 in Germany. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p.635-639, 1998.

BEUTIN, L.; STRAUCH, E.; FISCHER, I. Isolation fo *Shigella sonnei* lysogenic for a bacteriophage encoding gene for production of Shiga toxin. **Lancet**, v. 353, p.1498, 1999.

BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Evaluation of the VTEC-Screen "Seiken" test for detection of different types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC) in human stool samples. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 42, p. 1-8, 2002.

BOERLIN, P.; McEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J.B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L. Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n.3, p.497-503, 1999.

BOPP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed. Washington, D.C : ASM, 1999. p. 459-474.

BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; FROSCH, M.; KARCH, H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. **Microbiology**, v. 145, p. 1005-1014, 1999.

BÜRK, C.; DIETRICH, R.; AÇAR, G.; MORAVEK, M.; BÜLTE, M.; MÄRTLBAUER, E.M. Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1in *Escherichia coli* O157:H7 of Bovine Origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 2106-2112, 2003.

BURLAND, V.; SHAO, Y.; PERNA, N.T.; PLUNKETT, G.; SOFIA, H.J.; BLATTNER, F.R. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. **Nucl. Acids Res.**, v. 26, n. 18, p. 4196-4204, 1998.

CALDERWOOD, S.B.; AUCLAIR, F. DONOHUE-ROLFE, A.; KEUSCH, G.T.; MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.4364-4368, 1987.

CANTARELLI, V.; NAGAYAMA, K.; TAKAHASHI, A.; HONDA, T.; CAUDURO, P.F.; DIAS, C.A.G.; MEZZARI, A.; BRODT, T. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, p. 266-270, 2000.

CAPRIOLI, A.; LUZZI, I.; ROSMINI, F.; RESTI, C.; EDEFONTI, A.; PERFUMO, F.; FARINA, C.; GOGLIO, A.; GIANVITI, A.; RIZZONI, G. Communitywide Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome Associated with Non-O157 Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 208-211, 1994.

CAPRIOLI, A.; TOZZI, A.E.; RIZZONI, G.; KARCH, H. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Europe. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, n. 4, p. 578, 1997.

CARTER, A.O.; BORCZYK, A.A.; CARLSON, J.A.K.; HARVEY, B.; HOCKIN, J.C.; KARMALI, M.A.; KRISHNAN, C.; KORN, D.A.; LIOR, H. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 – Associated hemorrhagic colitis in a nursing home. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, n. 24, p. 1496-1500, 1987.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of Acute Gastroenteritis Attributable to *Escherichia coli* Serotype O104:H21 – Helena, Montana, 1994. **JAMA**. v. 274, n. 7, p.529-530, 1995.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Eating Ground Beef – United States, June-July 2003. **MMWR**. v. 51, n. 29, p.637-639, 2002.

CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 70, p.111-121, 1999.

CIMOLAI, N.; CARTER, J.E.; MORRISON, B.J.; ANDERSON, J.D. Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome. **J. Pediatr.**, v. 116, n. 4, p. 589-592, 1990.

COOLING, L.L.W.; WALKER, K. E.; GILLE, T.; KOERNER, T.A.W. Shiga Toxin Binds Human Platelets via Globotriaosylceramide (P<sup>k</sup> Antigen) and a Novel Platelet Glycosphingolipid. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 9, p.4355-4366, 1998.

CÓRDOVEZ, A.; PRADO, V.; MAGGI, L.; CORDERO, J.; MARTINEZ, J.; MISRAJI, A.; RIOS, R.; SOZA, G.; OJEDA, A.; LEVINE, M.M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Associated with Hemolytic-Uremic Syndrome in Chilean Children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 8, p. 2153-2157, 1992.

COUZIN, J. Cattle Diet Linked to Bacterial Growth. **Science**, v. 281, n. 5383, p.1578-1579, 1998.

DE BOER, E.; HEUVELINK, A.E. Methods for the detection and isolation of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol. Symp. Supl.**, v. 88, p. 133S-143S, 2000.

DIAFFENBACH, C.W.; DVEKSLER, G.S. **PCR Primer A Laboratory Manual**. CSHL, 1995.

DIEZ-GONZALEZ, F.; CALLAWAY, T.R.; KIZOULIS, M.G.; RUSSEL, J.B. Grain Feeding and the Dissemination of Acid-Resistant *Escherichia coli* from Cattle. **Science**, v. 281, n. 5383, p. 1666-1668, 1998.

DONOHUE-ROLFE, A.; KONDOVA, I.; OSWALD, S.; HUTTO, D.; TZIPORI, S.. *Escherichia coli* O157:H7 Strains That Express Shiga Toxin (Stx) 2 Alone Are More Neurotropic for Gnotobiotic Piglets Than Are Isotypes Producing Only Stx1 or Both Stx1 and Stx2. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1825-1829, 2000.



DOUGHTY, S.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ROBERTSON, M.; ROBINS-BROWNE, R.; HARTLAND, E.L. Identification of a Novel Fimbrial Gene Cluster Related to Long Polar Fimbriae in Locus of Enterocyte Effacement-Negative Strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6761-6769, 2002.

EKLUND, M.; SCHEUTZ, F.; SIITONEN, A. Clinical Isolates of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Serotypes, Virulence Characteristics, and Molecular Profiles of Strains of the Same Serotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 2829-2834, 2001.

EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEN, A. Clinical *Escherichia coli* Strains Carrying *stx* Genes: *stx* Variants and *stx*-Positive Virulence Profiles. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 12, p. 4585-4593, 2002.

ELBASHA, E.H.; FITZSIMMONS, T.D.; MELTZER, M.I. Costs and Benefits of a Subtype-Specific Surveillance System for Identifying *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 6, n. 3, p. 293-297, 2000.

FAN, E.; MERRITT, E. A.; VERLINDE, C.L.M.J.; HOL, W.G.J. AB 5 toxins: structures and inhibitor design. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, p. 680-686, 2000.

FARAH, S.M.; SILVA, L.R.; CASTILHOS, L.; KATO, M.A.M.F.; RAMOS, I.I.; IRINO, K. P212-Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle Paraná, Brazil. 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON 'SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, Edinburgh - Scotland. **Final Programme and Book of Abstracts** Edinburgh : Venue EICC, p.19, 2003.

FASANO, A. Cellular Microbiology: How Enteric Pathogens Socialize with Their Intestinal Host. **ASM News**, v. 63, n.5, p.259-265, 1997.

FENG, P. *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 1, n. 2, p. 47-52, 1995.

FEY, P. D.; WICKERT, R. S.; RUPP, M. E.; SAFRANEK, T.J.; HINRICH, S. H. Prevalence of Non-O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Diarrheal Stool Samples from Nebraska. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 6, p.530-533, 2000.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 11 ed. St. Louis : Mosby, 2002.

FRANKE, S.; HARMSSEN, D.; CAPRIOLI, A.; PIERARD, D.; WIELER, L.H.; KARCH, H. Clonal Relatedness of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* O101 Strains of Human and Porcine Origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 12, p. 3174-3178, 1995.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J.B.; KNUSTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 911-921, 1998.

FRATAMICO, P. M.; BUCHANAN, R. L.; COOKE, P. H. Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 sorbitol-positive mutant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 12, p. 4245-4252, 1993.

FÜRST, S.; SCHEEF, J.; BIELASZEWSKA, M.; RÜSSMAN, H.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. Identification and characterization of *Escherichia coli* strains O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shiga toxin genes. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 383-386, 2000.

GANNON, V.P.J.; TEERLING, C.; MASRI, S.A.; GYLES, C.L. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. **J. Gen. Microbiol.**, v. 136, p. 1125-1135, 1990.

GILLIGAN, P.H.; JANDA, J.M.; KARMALI, M.A.; MILLER, J.M. **CUMITECH 12A – Laboratory diagnosis of Bacterial Diarrhea**. Washington : ASM, 1992.

GOBIUS, K.S.; HIGGS, G.M.; DESMARCHELIER, P.M. Presence of Activatable Shiga Toxin Genotype (*stx<sub>2d</sub>*) in Shiga Toxigenic *Escherichia coli* from Livestock Sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 8, p. 3777-3783, 2003.

GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil Textbook of Medicine**. 21. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

GREENFIELD, L.; WHITE, T.J. Sample preparation methods. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology**. Washington : ASM, 1993. p. 122-137.

GRIFFIN, P. M.; BOYCE, T. G. in: SCHELD, M. W.; ARMSTRONG, D.; HUGHES, J. M. **Emerging infections**. Washington, D.C : ASM, 1998. p.137-146.

GUTH, B.E.C.; RAMOS, S.R.T.S.; CERQUEIRA, A.M.F.; ANDRADE, J.R.C.; GOMES, T.A.T. P339-Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Strains Isolated from Children in São Paulo, Brazil. 4<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON "SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS", Kyoto, Japan. **Programm & Abstracts**, p. 149, 2000.

GUTH, B.E.C.; RAMOS, S.R.T.S.; CERQUEIRA, A.M.F.; ANDRADE, J.R.C.; GOMES, T.A.T. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Children in São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1085-1089, 2002a.

GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. First Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolate from a Patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 5, p.535-536, 2002b.

GUTH, B.E.C.; GOMES, T.A.T.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Inability to Decarboxylate Lysine as a Presumptive Marker To Identify Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Serogroup O111. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3450, 2003a.

GUTH, B.E.C.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; GOMES, T.A.T.; NOVELLA, M.C.; CHINARELLI, S.H.; ROCHA, M.M.M. P226-Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated From Human Infections in São Paulo, Brazil, From 2000 to 2002. 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON 'SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, Edinburgh - Scotland. **Final Programme and Book of Abstracts** Edinburgh : Venue EICC, p.26, 2003b.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HASHIMOTO, H.; MIZUKOSHI, K.; NISHI, M.; KAWAKITA, T.; HASUI, S.; KATO, Y.; UENO, Y.; TAKEYA, R.; OKUDA, N.; TAKEDA, K. Epidemic of Gastrointestinal Tract Infection Including Hemorrhagic Colitis Attributable to Junior High School in Japan. **Pediatrics**, v. 103, n.1, p.1-5, 1999.

HAYASHI, T.; MAKINO, K.; OHNISHI, M.; KUROKAWA, K.; ISHII, K.; YOKOYAMA, K.; HAN, C.; OTHSUBO, E.; NAKAYAMA, K.; MURATA, T.; TANAKA, .; TOBE, T.; IIDA, T.; TAKAMI, H.; HONDA, T.; SASAKAWA, C.; OGASAWARA, N.; YASUNAGA, T.; KUHARA, S.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; SHINAGAWA, H. Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Genomic Comparison with a Laboratory Strain K-12 (Supplement). **DNA Research**, v. 8, p. 47-52, 2001.

HESS, R. D.; LIESKE, R.; WEBER, B. Meeting Summary - The 2nd International Symposium of the European Study Group on Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, n. 5, 1999.

HUPPERTZ, H.; BUSCH, D.; SCHMIDT, H.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. **J. Pediatr.**, v. 128, n.3, p.341-346, 1996.

IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; VAZ, T.M.I.; KANO, E.; KATO, M.A.M.F.; DIAS, A.M.G.; GONÇALVES, C.R.; GUTH, B.E.C. P226-Prevalence of Shiga Toxin And Intimin Gene Sequences Among *Escherichia coli* of Serogroups O26, O55, O111, O119 and O157 Isolated in São Paulo, Brazil. 4<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON "SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS", Kyoto, Japan. **Program & Abstracts**, p. 107, 2000.

IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; KATO, M.A.M.F.; NAVES, Z. V.F.; LARA, R. R.; MARCO, M.E.C.; ROCHA, M.M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A. T.; GUTH, B.E.C. O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Associated with Sporadic Cases of Diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 4, p.446-447, 2002.

IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I.; SOUZA, M.A.C.; CRUZ, A.S.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.; GUTH, B.E.C. P239-Serotypes And Virulence Properties of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Cattle, São Paulo, Brazil. 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON 'SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, Edinburgh - Scotland. **Final Programme and Book of Abstracts** Edinburgh : Venue EICC, p. 33, 2003.

JACKSON, M.P.; NEILL, R.J.; O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K.; NEWLAND, J.W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiol. Let.**, v. 44, p. 109-114, 1987.

JEANNMOUGIN, F.; THOMPSON, J.D.; GOUY, M.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 403-405, 1998.

JENKINS, C.; PERRY, N.T.; CHEASTY, T.; SHAW, D.J.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G.J.; SMITH, H.R.; PATON, A.; PATON, J.C. Distribution of the saa Gene in Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* of Human and Bovine Origins. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 1775-1778, 2003.

JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; BEZANSON, G.S. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **Lancet**, v.1, p.76, 1983.

KARCH, H.; MEYER, T.; RUSSMAN, H.; HEESEMANN, J. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 3464-3467, 1992.

KARCH, H.; JANETZKI-MITTMANN, C.; ALEKSIC, S.; DATZ, M. Isolation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains from Patients with Hemolytic-Uremic Syndrome by Using Immunomagnetic Separation, DNA-Based Methods, and Direct Culture. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 3, p. 516-519, 1996.

KARCH, H.; SCHMIDT, H.; BRUNDER, W. Plasmid-Encoded Determinants of *Escherichia coli* O157. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. ***Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C : ASM, 1998. p. 183-194.

KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; BITZAN, M.; SCHMIDT, H. Epidemiology and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 229-243, 1999.

KARMALI, M.A.; STEELE, B.T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, v.1, n. 8325, p.619-620, 1983a.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; STEELE, B.T. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. **Lancet**, v.ii, p.1299-1300, 1983b.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. The Association Between Idiopathic Hemolytic Uremic Syndrome and Infection by Verotoxin-Producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v.151, n. 5, p.775-782, 1985.

KEENE, W.E.; MCANULTY, J.M.; HOESLY, F.C.; WILLIAMS JR, P.; HEDBERG, K.; OXMAN, G.L.; BARRETT, T.J.; PFALLER, M.A.; FLEMING, D.W. A swimming-

associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, n. 9, p. 579-584, 1994.

KEHL, S.C. Role of the Laboratory in the Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, p. 2711-2715, 2002.

KESKIMÄKI, M.; SAARI, M.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: Prevalence and Characteristics of Isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 12, p. 3641-3646, 1998.

KESKIMÄKI, M.; EKLUND, M.; PESONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, p.151-156, 2001.

KHAN, A.; YAMASAKI, S.; SATO, T.; RAMAMURTHY, T.; PAI, A.; DATTA, S.; CHOWDHURY, N.R.; DAS, S.C.; SIKDAR, A.; TEIZO, T.; BHATTACHARYA, S.K.; TAKEDA, Y.; NAIR, G.B. Prevalence and Genetic Profiling of Virulence Determinants of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Beef, and Humans, Calcutta, India. **Emerg., Infect. Dis.**, v. 8, n. 1, p. 54-62, 2002.

KIMMITT, P. T.; HARWOOD, C. R.; BARER, M. R. Induction of type 2 Shiga toxin synthesis in *Escherichia coli* O157 by 4-quinolones. **Lancet**, v. 353, p.1588-1589, 1999.

KIMMITT, P. T.; HARWOOD, C. R.; BARER, M. R. Toxin Gene Expression by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: the Role of Antibiotics and the Bacterial SOS Response. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 6, n. 5, p.458-465, 2000.

KLEIN, E.J.; STAPP, J.R.; CLAUSEN, C.R.; BOSTER, D.R.; WELLS, J.G.; QIN, X.; SWERDLOW, D.L.; TARR, P.I. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea: A prospective point-of-care study. **J. Pediatrics**, v. 141, n.2, p.172-177, 2002.

KNIGHT, P. Hemorrhagic *E. coli*: The danger increases. **ASM News**, v. 59, p. 247-250, 1993.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WIN Jr., W.C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, 1997.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 18, n. 3, p.775-779, 1977.

KUNTZ, T. B.; KUNTZ, S. Enterohemorrhagic *E. coli* infection. **Prim. Care Update Ob/Gyns.**, v. 6, p.192-196, 1999.

LEUNG, P.H.M.; PEIRIS, J.S.M.; NG, W.W.S.; ROBINS-BROWNE, R.M.; BETTELHEIM, K.A.; YAM, W.C. A Newly Discovered Verotoxin Variant, VT2g,

Produced by Bovine Verotoxinogenic *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 12, p. 7549-7553, 2003.

LEW, J.F.; LeBARON, C.W.; GLASS, R.I.; TOROK, T.; GRIFFIN, P.M.; WELLS, J.G.; JURANEK, D.D.; WAHLQUIST, S.P. Recommendations for Collection of Laboratory Specimens Associated with Outbreaks of Gastroenteritis. **MMWR**, v.39, n. RR-14, p. 1-13, 1990. Disponível : <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001829.htm>. Acesso em: 26 ago. 2002.

LINGWOOD, C. A. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. **Trends in microbiology**, v. 4, n. 4, p.147-153, 1996.

LOPEZ, E.L.; DIAZ, M.; GRINSTEIN, S.; DEVOTO, S.; MENDILAHARZU, F.; MURRAY, B.E.; ASHKENAZI, S.; RUBEGLIO, E.; WOLOJ, M.; VASQUEZ, M.; TURCO, M.; PICKERING, L.K.; CLEARY, T.G. Hemolytic Uremic Syndrome and Diarrhea in Argentine Children: The Role of Shiga-like Toxins. **J. Infect. Dis.**, v. 160, n. 3, p. 469-475, 1989.

MATSUSHIRO, A.; SATO, K.; MIYAMOTO, H.; YAMAMURA, T.; HONDA, T. Induction of Prophages of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with Norfloxacin. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 7, p. 2257-2260, 1999.

McCARTHY, T.A.; BARRETT, N.L.; HADLER, J.L.; SALSBURY, B.; HOWARD, R.T.; DINGMAN, D.W.; BRINKMAN, C.D.; BIBB, W.F.; CARTTER, M.L. Hemolytic-Uremic Syndrome and *Escherichia coli* O121 at a Lake in Connecticut. **Pediatrics**, v.108, n.4, p. 1-7, 2001.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D.; VEKRIS, A.; PETRY, K.G.; BONNET, J.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; MÉGRAUD, F. Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* Model. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 4, p. 995-998, 1997.

MUKHERJEE, J.; CHIOS, K.; FISHWILD, D.; HUDSON, D.; O'DONNELL, S.; RICH, S.M.; DONOHUE-ROLFE, A.; TZIPORI, S. Human STX2-Specific Monoclonal Antibodies Prevent Systemic Complications of *Escherichia coli* O157:H7 Infection. **Infect. Immun.**, v.70, n. 2, p. 612-619, 2002a.

MUKHERJEE, J.; CHIOS, K.; FISHWILD, D.; HUDSON, D.; O'DONNELL, S.; RICH, S.M.; DONOHUE-ROLFE, A.; TZIPORI, S. Production and Characterization of Protective Human Antibodies against Shiga Toxin 1. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 10, p. 5896-5899, 2002b.

MURASE, T.; YAMAI, S.; WATANABE, H. Changes in Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns in Clinical Isolates of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Loss of Shiga Toxin Genes. **Curr. Microbiol.**, v. 38, p. 48-50, 1999.

NAKAO, H.; KIMURA, K.; MURAKAMI, H.; MARUYAMA, T.; TAKEDA, T. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Japan. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 34, p. 289-297, 2002.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 1, p.142-201, 1998.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard- Eighth Edition**. v. 23, n.1, 2003.

NEWLAND, J.W.; STROCKBINE, N.A.; MILLER, S.F.; O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. Cloning of Shiga-Like Toxin Structural Genes from a Toxin Converting Phage of *Escherichia coli*. **Science**, v. 230, p.179-181, 1985.

O'BRIEN, A.D.; LIVELY, T.A.; CHEN, M.E.; ROTHMAN, S.W.; FORMAL, S.B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) lyke cytotoxin. **Lancet**, v. 1, p. 702, 1983.

O'BRIEN, A.D.; CHEN, M.E.; HOLMES, R.K.; KAPER, J.; LEVINE, M. Environmental and human isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-lyke cytotoxin. **Lancet**, v. 2, p. 77-78, 1984.

O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-Like Toxins. **Microbiol. Rev.**, v. 51, n.2, p. 206-220, 1987.

O'LOUGHLIN, E. V.; ROBINS-BROWNE, R.M. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. **Microbes and Infections**, v. 3, p. 493-507, 2001.

OJEDA, A.; PRADO, V.; MARTINEZ, J.; ARELLANO, C.; BORCZYK, A.; JOHNSON, W.; LIOR, H.; LEVINE, M.M. Sorbitol-Negative Phenotype among Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains of Different Serotypes and from Different Sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n.8, p.2199-2201, 1995.

OLSVIK, Ø.; STROCKBINE, N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like Toxin Genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology**. Washington : ASM, 1993. p. 271-276.

PAI, C.H.; AHMED, N.; LIOR, H.; JOHNSON, W.N.; SIMS, H.S.; WOODS, D.E. Epidemiology of Sporadic Diarrhea Due to Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*: A Two-Year Prospective Study. **J. Infect. Dis.**, v.157, n. 5, p.1054-1057, 1988.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K.D.; THOMSON, N.R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K.L.; BENTLEY, S.D.; HOLDEN, M.T.G.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R.M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FEITWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T.T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T.S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; Ó'GAORA, P.; PARRY, C.;

QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. **Nature**, v. 413, p. 848-852, 2001.

PATON, A.; PATON, J.C.; MANNING, P.A. Polymerase chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II operons. **Microbial Pathogenesis**, v. 15, p.77-82, 1993.

PATON, A.; PATON, J.C.; GOLDWATER, P.N.; HEUZENROEDERB, M. W.; MANNING, P.A. Sequence of a variant Shiga-like toxin type-1 operon of *Escherichia coli* O111:H-. **Gene**, v. 129, p. 87-92, 1993a.

PATON, A.; PATON, J.C.; GOLDWATER, P.N.; MANNING, P.A. Direct Detection of *Escherichia coli* Shiga-Like Toxin Genes in Primary Fecal Cultures by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n.11, p.3063-3067, 1993b.

PATON, A. W.; BEUTIN, L.; PATON, J. C. Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. **Gene**, v. 153, p. 71-74, 1995.

PATON, A.; BOURNE, A.J.; MANNING, P.A.; PATON, J.C. Comparative Toxicity and Virulence of *Escherichia coli* Clones Expressing Variant and Chimeric Shiga-like Toxin Type II Operons. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 7, p. 2450-2458, 1995.

PATON, A. W.; PATON, J. C. *Enterobacter cloacae* Producing a Shiga-Like Toxin II-Related Cytotoxin Associated with a Case of Hemolytic-Uremic Syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n.2, p.463-465, 1996.

PATON, A. W.; RATCLIFF, R.M.; DOYLE, R.M.; SEYMOUR-MURRAY, J.; DAVOS, J.; LANSER, J.A.; PATON, J. C. Molecular Microbiological Investigation of an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome Caused by Shiga-Like Toxin Producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n.7, p.1622-1627, 1996.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Instability of a Shiga Toxin Type 2 Gene in *Enterobacter cloacae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n.7, p.1917, 1997.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 3, p.450-479, 1998a.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub> and *rfb*<sub>O157</sub>. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n.2, p.598-602, 1998b.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6999-7009, 2001.



PAVIA, A.T.; NICHOLS, C.R.; GREEN, D.P.; TAUXE, R.V.; MOTTICE, S.; GREENE, K.D.; WELLS, J.G.; SIEGLER, R.L.; BREWER, E.D.; HANNON, D.; BLAKE, P.A. Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: Clinical and epidemiological observations. **J. Pediatr.**, v. 116, n. 4, p. 544-551, 1990.

PERNA, N.T.; MAYHEW, G.F.; PÓSFAL, G.; ELLIOTT, S.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.; BLATTNER, F.R. Molecular Evolution of a Pathogenicity Island from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 8, p. 3810-3817, 1998.

PERNA, N.T.; PLUNKETT III, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J.D.; ROSE, D.J.; MAYHEW, G.F.; EVANS, P.S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H.A.; PÓSFAL, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E.J.; DAVIS, N.W.; LIM, A.; DIMALANTA, E.T.; POTAMOUSIS, K.D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T.S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D.C.; WEICH, R.A.; BLATTNER, F.R. Genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, p. 529-533, 2001.

PIÉRARD, D.; MUYLDERMANS, G.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n.11, p. 3317-3322, 1998.

PROCTOR, M.E.; KURZYNSKI, T.; KOSCHMANN, C.; ARCHER, J.R.; DAVIS, J.P. Four Strains of *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from Patients during an Outbreak of Disease Associated with Ground Beef: Importance of Evaluating Multiple Colonies from an Outbreak-Associated Product. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.4, p.1530-1533, 2002.

RECKTENWALD, J.; SCHMIDT, H. The Nucleotide Sequence of Shiga Toxin (Stx) 2e-Encoding Phage P27 Is Not Related to Other Stx Phage Genomes, but the Modular Genetic Structure Is Conserved. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 4, p. 1896-1908, 2002.

RICOTTI, G.C.; BUONOMINI, M.I.; MERLITTI, A.; KARCH, H.; LUZZI, I.; CAPRIOLI, A. A Fatal Case of Hemorrhagic Colitis, Thrombocytopenia, and Renal Failure Associated with Verocytotoxin-Producing, Non-O157 *Escherichia coli*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 19, p.815-816, 1994.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

RIVAS, M.; BALBI, L.; MILIWEBSKY, E.S.; GARCIA, B.; TOUS, M.I.; LEARDINI, N.A.; PRIETO, M.A.; CHILLEMI, G.M.; DE PRINCIPI, M.E.T. Síndrome uremico hemolítico en niños de Mendoza, Argentina: asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 58, n.1, p.1-7, 1998.

- ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; SCHOEN, F.J. **Robbins – Patologia estrutural e funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.
- RONDEAU, E.; PERALDI, M. *Escherichia coli* and the Hemolytic-Uremic Syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 335, n. 9, p. 660-662, 1996.
- RÜSSMANN, H.; SCHMIDT, H.; HEESEMANN, J.; CAPRIOLI, A.; KARCH, H. Variants of Shiga-like toxin II constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, p. 338-343, 1994.
- SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. *Escherichia coli* Gastrointestinal Infections. In: \_\_\_\_\_. **Bacterial Pathogenesis – A molecular approach**. Washington, D.C : ASM, 1994. p. 190-204.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A laboratory manual**. 2 ed. New York : CSH, 1989.
- SANDVIG, K.; RYD, M.; GARRED, O.; SCHWEDA, E.; HOLM, P. K.; van DEURS, B. Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butiric acid and cAMP. **J. Cell Biol.**, v. 126, p. 53-64, 1994.
- SANDVIG, K.; van DEURS, B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. **EMBO Journal**, v. 19, n. 22, p. 5943-5950, 2000.
- SANDVIG, K.; van DEURS, B. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. **FEBS Letters**, v. 529, p. 49-53, 2002.
- SANGER, F.; NICKLED, S.; COULSON, A.R. Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SCHMIDT, H.; MONTAG, M.; BOCKEMÜHL, J.; HEESEMAN, J.; KARCH, H. Shiga-Like Toxin II-Related Cytotoxins in *Citrobacter freundii* Strains from Humans and Beef Samples. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 2, p. 534-543, 1993.
- SCHMIDT, H.; KARCH, H. Enterohemolytic Phenotypes and Genotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111 Strains from Patients with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 10, p. 2364-2367, 1996.
- SCHMIDT, H.; GEITZ, C.; TARR, P.I.; FROSCH, M.; KARCH, H. Non-O157:H7 Pathogenic Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Phenotypic and Genetic Profiling of Virulence Traits and Evidence of Clonality. **J. Infect. Dis.**, 179, p. 115-123, 1999.
- SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L.H.; KARCH, H. A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 3, p. 1205-1208, 2000.

SCHMITT, C. K.; MCKEE, M.L.; O'BRIEN, A. D. Two Copies of Shiga-Like Toxin II-Related Genes Common in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Are Responsible for the Antigenic Heterogeneity of the O157:H<sup>-</sup> Strain E32511. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 3, p.1065-1073, 1991.

SCHMITT, C. K.; MEYSICK, K. C.; O'BRIEN, A. D. Bacterial toxins: friends or foes? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, n. 2, p.224-234, 1999.

SCHROEDER, C.M.; MENG, J.; ZHAO, S.; DEBROY, C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, C.; McDERMOTT, P.F.; WAGNER, D.D.; WALKER, R.D.; WHITE, D.G. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from Animals and Humans. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 12, p. 1409-1414, 2002.

SILVA, L.R., **Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7 em bovinos abatidos em matadouro frigorífico de Curitiba – Paraná.** Curitiba, 2002. 144f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Paraná.

SMITH, H.R.; GROSS, R.J.; ROWE, B.; FRY, N.K.; SCOTLAND, S.M. Haemorrhagic colitis and Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in England and Wales. **Lancet**, v.1, p. 1062-1065, 1987.

STROCKBINE, N.A.; MARQUES, L.R.M.; NEWLAND, J.W.; SMITH, H.W.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Two Toxin-Converting Phages from *Escherichia coli* O157:H7 Strain 933 Encode Antigenically Distinct Toxins with Similar Biologic Activities. **Infect. Immun.**, v. 53, n. 1, p. 135-140, 1986.

STROCKBINE, N.A.; JACKSON, M.P.; SUNG, L.M.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and Sequencing of the Genes for Shiga Toxin from *Shigella dysenteriae* Type 1. **Infect. Immun.**, v. 170, n. 3, p. 1116-1122, 1988.

STROCKBINE, N.A.; WELLS, J.G.; BOPP, C.A.; BARRETT, T.J. Overview of Detection and Subtyping Methods. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. ***Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains.** Washington, D.C : ASM, 1998. p. 331-356.

TANG, Y-W.; PERSING, D. H. Molecular Detection and Identification of Microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology.** 7.ed. Washington : ASM, 1999. p. 215-244.

TARR, P.I.; NEILL, M.A. Perspective: The Problem of Non-O157:H7 Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 174, p. 1136-1139, 1996.

TARR, P.I.; FOUER, L.S; STAPLETON, A.E.; WILSON, R.A.; KIM, H.H.; VARY, J.C.; CLAUSEN, C.R. Hemolytic-uremic syndrome in a six-year-old girl after a urinary tract infection with Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2. **N. Engl. J. Med.**, v. 335, n. 9, p. 635-638, 1996.

TARR, P.I. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections: Challenges and Opportunities. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. ***Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C : ASM, 1998. p. 393-402.

TARR, P.I.; BILGE, S.S.; VARY JR, J.C.; JELACIC, S.; HABEEB, R.L.; WARD, T.R.; BAYLOR, M.R.; BESSER, T.E. Iha: a Novel *Escherichia coli* O157:H7 Adherence-Confering Molecule Encoded on a Recently Acquired Chromosomal Island of Conserved Structure. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 3, p. 1400-1407, 2000.

THOMAS, A.; CHEASTY, T.; CHART, H.; ROWE, B. Isolation of Vero Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O9ab:H- and O101:H- Carrying VT2 Variant Gene Sequences from a Patient with Haemolytic Uraemic Syndrome. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 13, p. 1074-1076, 1994.

TORRES, A.G.; GIRON, J.A.; PERNA, N.T.; BURLAND, V.; BLATTNER, F.R.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, J.B. Identification and Characterization of *lpfABCC'DE*, a Fimbrial Operon of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 10, p. 5416-5427, 2002.

TORRES, A.G.; KAPER, J.B. Multiple Elements Controlling Adherence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa Cells. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 9, p. 4985-4995, 2003.

TSCHÄPE, H.; PRAGER, R.; STRECKEL, W.; FRUTH, A.; TIETZE, E.; BOHME, G. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. **Epidemiol. Infect.**, v. 114, p. 441-450, 1995.

TSCHÄPE, H.; FRUTH, A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: MÜLDORFER, I.; SCHÄFER, K.P. Emerging Bacterial Pathogens. v. 8. In: SCHMIDT, A. (Ed.) **Contributions to Microbiology**. Basel : Karger, 2001. p. 1-11.

TZIPORI, S.; CHOW, C.W.; POWELL, H.R. Cerebral Infection with *Escherichia coli* O157:H7 in humans and gnotobiotic piglets. **J. Clin. Pathol.**, v. 41, p.1099-1103, 1988.

WAGNER, P.L.; WALDOR, M.K. Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p.3985-3993, 2002.

WEINSTEIN, D.L.; JACKSON, M.P.; SAMUEL, J.E.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and Sequencing of a Shiga-Like Toxin Type II Variant from an *Escherichia coli* Strain Responsible for Edema Disease of Swine. **J. Bacteriol.**, v. 170, n. 9, p. 4223-4230, 1988.

WERBER, D.; FRUTH, A.; BUCHHOLZ, U.; PRAGER, R.; KRAMER, M.H.; AMMON, A.; TSCHÄPE, H. Strong Association Between Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and Virulence Genes *stx*<sub>2</sub> and *eae* as Possible Explanation for Predominance of Serogroup O157 in Patients with Haemolytic Uraemic Syndrome. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p. 726-730, 2003.

WHITTAM, T.S. Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. ***Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C : ASM, 1998. p. 195-209.

WHO/CSR/APH/98.8. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Berlin, Germany 23-26 June 1998. **World Health Organization**. WHO/FSF/FOS/97.6. 1998

WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; SCOTLAND, S.M.; FIELD, A.M.; ROWE, B. Heterogeneity of *Escherichia coli* Phages Encoding Vero Cytotoxins: Comparison of Cloned Sequences Determining VT1 and VT2 and Development of Specific Gene Probes. **J. Gen. Microbiol.**, v. 133, p. 1309-1317, 1987.

WONG, C.S.; JELACIC, S.; HABEEB, R.L.; WATKINS, S.L.; TARR, P.I. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, n. 26, p. 1930-1936, 2000.

YAMAGAMI, S.; MOTOKI, M.; KIMURA, T.; IZUMI, H.; TAKEDA, T.; KATSUURA, Y.; MATSUMOTO, Y.. Efficacy of Postinfection Treatment with Anti-Shiga Toxin (Stx) 2 Humanized Monoclonal Antibody TMA-15 in Mice Lethally Challenged with Stx-Producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p.738-742, 2001.

ZHANG, X.; McDANIEL, A. D.; WOLF, L.E.; KEUSCH, G.T.; WALDOR, M.K.; ACHESON, D.W.K. Quinolone Antibiotics Induce Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages Toxin Production, and Death in Mice. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p.664-670, 2000.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Identification, Characterization, and Distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant (*stx<sub>1c</sub>*) in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p.1441-1446, 2002.

## **ANEXOS**



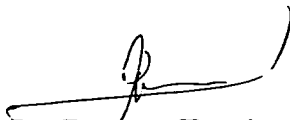
Curitiba, 17 de dezembro de 2.002.

Ilmo (a) Sr. (a)  
Profª Cyntia Maria Telles Fadel Picheth  
**Nesta**

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "IDENTIFICAÇÃO E CARCTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *ESCHERICHIA COLI* SHIGA TOXIGÊNICA (STEC)", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 29 de outubro de 2.002, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 , 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. **Protocolo CEP-HC Nº 062EXT016/2002-10.**

Atenciosamente,



**Prof. Dr. Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em  
Seres Humanos do Hospital de Clinicas – UFPR

REATIVO	PROCEDÊNCIA
100pb Ladder	Amershan Biosciences (Piscataway, NJ, USA)
1Kb DNA Ladder Oligonucleotídeos iniciadores	Invitrogen (São Paulo, Brasil)
Ácido bórico Álcool etílico absoluto EDTA NaCl Tris	Merck (Darmstad, Germany)
Ágar Müller Hinton	Oxoid (Hampshire, England)
Ágar Tripticaseína de Soja (TSA) Ágar MacConkey	Difco (São Paulo, Brasil)
Agarose CTAB Ficoll	Gibco (USA)
Caldo Tripticaseína de Soja (TSB)	Diagnostics Pasteur (Marnes la Coquette, France)
dNTP	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Glicerol Lisozima	Sigma (USA)
Proteinase K (Fungal) Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico	Invitrogen (Canada)
SDS	Allied Signal Riedel-de Hën (Seelze, Germany)
Taq DNA Polimerase	Invitrogen (Brasil) Lab Trade do Brasil